



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**Estudio de la actividad antineoplásica de los compuestos
P8 y C14 en cáncer de pulmón de células no pequeñas**

TESIS

Que presenta:

EDUARDO RAYA TELLEZ

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

En la especialidad de

BIOMEDICINA MOLECULAR

Director de la Tesis

Dr. Miguel Ángel Vargas Mejía

Ciudad de México

Octubre 2024

Miembros del comité tutorial

Dra. Leticia Cedillo Barrón

Departamento de Biomedicina Molecular

CINVESTAV-IPN ZACATENCO

Dra. Ma. Teresa Estrada García

Departamento de Biomedicina Molecular

CINVESTAV-IPN ZACATENCO

Agradecimiento al CONAHCyT

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Biomedicina del CINVESTAV-IPN bajo la dirección del Dr. Miguel Ángel Vargas Mejía.

Durante la realización de este trabajo el autor fue beneficiado con una beca durante toda su estancia por parte del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT)

Le agradezco al CONAHCyT por haber otorgado una beca para realizar mis estudios de Maestría en el CINVESTAV.

Agradecimientos

Quiero dedicar el primer agradecimiento al departamento de biomedicina molecular por darme la oportunidad de entrar a esta maravillosa maestría, aunque ha sido un largo recorrido la satisfacción de llegar hasta el final solo se puede comparar con los logros más ambiciosos de la vida.

Quiero agradecer al Dr. Miguel Vargas por contagiarme esa chispa por la investigación, si no se hubiera detenido a contarme sobre mi futuro quien sabe en donde estaría. Es una gran persona y un experto en su campo. Gracias por inspirar mi curiosidad.

Mi tercer agradecimiento va directo para mi familia mi madre Norma Tellez, mi padre Ángel Raya mis hermanas Karina Raya, Mayret Raya y mis hermanos Sergio Y Rubén Raya. Mis padres siempre estuvieron en el momento clave apoyándome y logrando que yo me mantuviera firme en mi voluntad.

Los amo con todo mi corazón y desde lo profundo de mi ser puedo sentirme orgulloso de ser su hijo; no podría ser la persona más feliz y afortunada de no haber sido por ustedes. Gracias por todo y espero que estén orgullosos y en paz. Gracias por ser mi fortaleza

Mi linda hermana Karina siempre preocupándose por todos a su alrededor y estando en los momentos tristes y alegres; que dicha de que seas mi hermanita y poder ser quien te inspire. Gracias por darme valor.

Mis hermanos Sergio y Rubén tan ambiciosos como solidarios y soñadores. Su ejemplo de llegar más lejos que nadie se incrustó en mi mente y logro que tuviera más ambición. Gracias por ser mi inspiración.

Mi cuarta dedicatoria es para mi querida Gabriela Xaxni; mi único amor. Me ha inspirado para ser una persona más trabajadora, responsable, tierna y leal. Trabajar juntos, apoyarnos mutuamente y comprender la parte opuesta han logrado que lleguemos a nuevas cimas y de no haber sido por ella estoy seguro de que hoy no sería quien soy en su totalidad. Gracias por inculcarme la perseverancia.

Quiero agradecer a mis dos primos Marco Tellez y Ricardo Garcés en los momentos difíciles lograban que mi mente se calmara. Si no hubiéramos tenido esas noches de videojuegos seguramente estaría hospitalizado de tanto estrés. Gracias por tanta diversión.

Quiero agradecer a todos los miembros de mi familia Tellez en especial a mi tía Alicia Tellez, siempre tan atenta, amable, carismática y comprensiva. También agradezco a mis amigos y amigas con los que disfruté de su compañía y amistad.

También quiero agradecer a la Auxiliar de Investigación Ma de Jesús Almaraz Barrera por su apoyo y asesoría en las diferentes técnicas empleadas en la realización experimental de este trabajo.

Por último, quiero mandar un agradecimiento a todas las personas que estuvieron a mi alrededor, mis compañeras de laboratorio, a los doctores que me prestaron su ayuda durante mi estancia, los compañeros de mi carrera estudiantil y un especial agradecimiento a la Dr. Norma Angelica Oviedo por abrirme las puertas de este maravilloso mundo. Gracias por ser parte de mi camino.

Índice

Índice de figuras.....	9
Índice de tablas	10
Resumen	11
Abstract.....	12
1. Abreviaturas	13
2. Introducción	15
2.1. Generalidades de pulmón	15
2.1.1. Células implicadas en cáncer de pulmón	16
2.2. Factores de Riesgo	19
2.3. Cáncer de pulmón	22
2.4. Epidemiología del cáncer de pulmón.....	23
2.5. Tipos de cáncer de pulmón.....	25
2.6. Genética y progresión en cáncer de pulmón	28
2.6.1. EGFR.....	28
2.6.2. EML4-ALK	28
2.6.3. ROS1.....	29
2.6.4. p53.....	29
2.6.5. Ras	29
2.7. Diagnóstico del cáncer de pulmón.....	31
2.8. Tratamiento contra el cáncer de pulmón.....	32
2.8.1. Cirugía	32
2.8.2. Radioterapia	33
2.8.3. Quimioterapia	33
2.8.4. Terapia dirigida.....	36
2.8.5. Inmunoterapia	41
2.9. KRAS	42

2.9.1. Fosfodiesterasas (PDEs)	46
2.9.2. Fosfodiesterasa 6 (PDE6).....	46
2.9.3. Complejo KRAS4B/PDE6δ	47
3. Antecedentes	48
3.1. Efecto antineoplásico de los compuestos P8 y C14 en PDAC con K-Ras ^{mut}	48
3.2. Efecto antineoplásico de los compuestos P8 y C14 en Cáncer de mama triple negativo con K-Ras ^{mut}	51
3.3. PGK1	53
4. Justificación	55
5. Hipótesis	55
6. Objetivo General	55
7. Objetivos Específicos	55
8. Desarrollo Experimental	56
9. Materiales y métodos	56
9.1. Compuestos	56
9.2. Líneas Celulares	56
9.3. Descongelamiento.....	57
9.4. Subcultivo de células.....	57
9.5. Actividad citotóxica y determinación del IC ₅₀	58
9.6. Ensayo de Western Blot	59
9.6.1. Extracción de proteína total.	59
9.6.2. Determinación de la activación de ERK y AKT.	60
9.7. Ensayo de muerte celular por apoptosis.....	61
9.8. Inmunofluorescencia	62
10. Resultados	64
10.1. Determinación del efecto citotóxico de los compuestos P8 y C14 sobre la viabilidad celular en las líneas celulares de NSCLC; A549 (K-Ras4B ^{G12S}), Calu1 (K-Ras4B ^{G12C}) y H1975 (EGFR ^{L858R,T790M}).....	64

10.2. Evaluación del impacto de los compuestos P8 y C14 en las vías de señalización ERK/AKT en las líneas celulares A549 (K-Ras4B ^{G12S}), Calu1 (K-Ras4B ^{G12C}) y H1975 (EGFR ^{L858R,T790M}).	68
10.3. Evaluación sobre el tipo de muerte celular que promueven los compuestos P8 y C14 en las líneas celulares A549 (K-Ras4B ^{G12S}), Calu1 (K-Ras4B ^{G12C}) y H1975 (EGFR ^{L858R,T790M}).	71
10.4. Evaluación del el impacto de los compuestos P8 y C14 sobre la localización celular de la enzima PGK1 en las líneas celulares A549 (K-Ras4B ^{G12S}), Calu1 (K-Ras4B ^{G12C}) y H1975 (EGFR ^{L858R,T790M}).	75
11. Discusión	81
12. Conclusiones	88
13. Perspectivas	88
14. Modelo biológico	89
15. Bibliografía	91

Índice de figuras

Figura 1 Organización general de los pulmones.	15
Figura 2 Sección transversal de la tráquea que ilustra su relación con los pulmones.....	16
Figura 3 Microambiente en el pulmón.	18
Figura 4 Incidencia y mortalidad en México de cáncer de pulmón.....	23
Figura 5 Incidencia y mortalidad a nivel mundial de cáncer de pulmón.	24
Figura 6 Activación e inactivación de las proteínas pertenecientes a la familia RAS y su región carboxilo terminal.	30
Figura 7 Asociación de los aminoácidos de la región carboxilo terminal con la membrana celular entre las diferentes isoformas de KRAS, NRAS y HRAS.	31
Figura 8 Estructuración de las proteínas de la familia de K-Ras.	43
Figura 9 Modificaciones post traduccionales de las proteínas Ras.....	44
Figura 10 Vías que pueden activar las proteínas oncogénicas de la familia Ras.....	45
Figura 11 Inhibidores que se utilizan para detener la señalización de las vías que activan las proteínas de la familia Ras.	46
Figura 12 Transporte de K-Ras4B hacia la membrana plasmática.	47
Figura 13 Complejo K-Ras4B~PDEδ.	48
Figura 14 Interacción del compuesto C14 con el complejo K-Ras4B ^{G12C} ~PDE6δ.	50
Figura 15 Efecto de la hiperactivación de ERK en la translocación de PGK1 hacia la mitocondria.	54
Figura 16 Evaluación del efecto citotóxico de los compuestos P8 y C14 sobre las líneas celulares de NSCLC; Calu1 K-Ras ^{G12C} , A549 K-Ras ^{G12S} y H1975 EFGR ^{L858R,T790M}	65
Figura 17 Los compuestos P8 y C14 disminuyen la viabilidad celular de NSCLC con K-Ras ^{G12C} y K-Ras ^{G12S}	67
Figura 18 Efecto de los compuestos P8 y C14 sobre la fosforilación de ERK y AKT.	70
Figura 19 Los compuestos P8 y C14 inducen la muerte celular por apoptosis en líneas celulares con K-Ras mutado.	74
Figura 20 Efecto de los tratamientos con P8, C14 y cisplatino sobre la localización celular de PGK1 en la línea celular A549 Kras4B ^{G12S}	76
Figura 21 Efecto de los tratamientos con P8, C14 y cisplatino sobre la localización celular de PGK1 en la línea celular Calu1 Kras4B ^{G12C}	78
Figura 22 Efecto de los tratamientos P8, C14 y cisplatino sobre la localización celular de PGK1 en la línea celular H1975 EFGR ^{L858R,T790M}	80
Figura 23 Modelo celular del funcionamiento del compuesto P8 y C14 en la línea celular A549 (K-Ras4B ^{G12S}) de cáncer de pulmón de células no pequeñas.	90

Figura 24 Modelo celular del funcionamiento del compuesto P8 en la línea celular Calu1 (K-Ras4B ^{G12C}) de cáncer de pulmón de células no pequeñas.....	91
--	----

Índice de tablas

Tabla 1 Compuestos que componen al cigarro de tabaco.	20
Tabla 2 Contaminantes dañinos presentes en el aire que respiramos y que dañan a las células en los pulmones.....	21
Tabla 3 Tasa de supervivencia en cáncer de pulmón de células no pequeñas con base al estudio SEER.	25
Tabla 4 Tasa de supervivencia en cáncer de pulmón de células pequeñas con base al estudio SEER.	25
Tabla 5 Origen celular de diferentes tipos de cáncer de pulmón en modelos murinos.....	27
Tabla 6 Valores de IC ₅₀ a 24 y 48 horas para las líneas celulares MCF-10A, MDA-MB-321, MDA-MB-231RR y MCF-7	52
Tabla 7 IC ₅₀ de P8, C14 y CDDP.	67
Tabla 8 Lista de los compuestos analizados por la Dra. Diana Casique Aguirre.	88

Resumen

El cáncer de pulmón es la segunda neoplasia con más incidencia a nivel global y sin embargo es la neoplasia que causa el mayor número de muertes por año, el tipo de cáncer pulmonar que más abunda a nivel global es el cáncer de pulmón de células no pequeñas. En nuestro laboratorio se analizaron dos compuestos con propiedades antineoplásicas llamados C14 y P8, estos dos compuestos se caracterizaron tanto *in vivo* mediante xenoinjertos en ratones nu/nu como *In vitro* en líneas celulares de cáncer de páncreas con mutaciones en K-Ras4B, mostrando una reducción en el crecimiento tumoral de hasta un 95 % y en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo con una reducción de hasta un 41.6% en el crecimiento tumoral. En el presente trabajo los compuestos P8 y C14 fueron probados en tres líneas de cáncer de pulmón, A549 con mutación en K-Ras4B^{G12S}, Calu 1 con mutación en K-Ras4B^{G12C} y H1975 con K-Ras4B^{WT} pero con mutación en EGFR^{L858R,T790M}. Los resultados muestran que ambos compuestos presentan un efecto citotóxico en las tres líneas celulares, P8 requiere concentraciones de 80, 95 y 167 μM para las líneas A549, Calu1 y H1975 respectivamente, mientras que C14 requiere concentraciones de 163, 193 y 149 μM para las líneas A549, Calu1 y H1975 respectivamente. Además, ambos compuestos reducen hasta un 40 % la activación de los efectores ERK y AKT en la línea A549, solamente el compuesto P8 reduce la activación de ERK un 30% en la línea Calu1 y ambos compuestos reducen la activación de ERK y AKT un 40 % en la línea H1975. Se determinó que el compuesto P8 promueve la muerte por apoptosis en un 30.91 % en la línea A549 y un 34.73 % en la línea Calu1, mientras que en la línea celular H1975 ambos compuestos P8 y C14 promovieron la muerte celular por apoptosis en un 52.53% y 58.63% respectivamente. También se observó que solamente el compuesto P8 reduce la localización de PGK1 en mitocondria y en núcleo. Estos datos sugieren que el compuesto P8 funciona como un agente antineoplásico en líneas de cáncer de pulmón A549 y Calu1 con mutaciones en K-Ras4B^{G12S} y K-Ras4B^{G12C} respectivamente.

Abstract

Lung cancer is the second most common neoplasm globally, yet it is the neoplasm that causes the highest number of deaths per year. The most prevalent type of lung cancer worldwide is non-small cell lung cancer. In our laboratory, two compounds with antineoplastic properties, called C14 and P8, were analyzed. These two compounds were characterized both in vivo and in vitro in pancreatic cancer cell lines with mutations in K-Ras4B, showing a significant reduction on tumor growth of 95%, and in triple-negative breast cancer cell lines with a reduction of 41.6% on tumor growth. In the present work, the compounds P8 and C14 were tested on three lung cancer cell lines: A549 with K-Ras4BG12S mutation, Calu 1 with K-Ras4BG12C mutation, and H1975 with K-Ras4BWT but with EGFR L858R, T790M mutation. The results show that both compounds exhibit a cytotoxic effect on the three cell lines. P8 requires concentrations of 80, 95, and 167 μM for the A549, Calu1, and H1975 lines, respectively, while C14 requires concentrations of 163, 193, and 149 μM for the A549, Calu1, and H1975 lines, respectively. Additionally, both compounds reduce up to 40% of ERK and AKT effectors activation in the A549 line, only compound P8 reduces ERK activation by 30% in the Calu1 line, and both compounds reduce ERK and AKT activation by 40% in the H1975 line. It was determined that compound P8 promotes apoptosis in 30.91% of the A549 line and 34.73% of the Calu1 line, while in the H1975 cell line, both compounds P8 and C14 promoted cell death by apoptosis in 52.53% and 58.63%, respectively. It was also observed that only compound P8 reduces the localization of PGK1 in mitochondria and nucleus. These data suggest that compound P8 acts as an antineoplastic agent in A549 and Calu1 lung cancer lines with mutations in K-Ras4BG12S and K-Ras4BG12C, respectively.

1. Abreviaturas

1. **Ca²⁺**: Calcio.
2. **NEB**: Cuerpos Neuroepiteliales.
3. **IARC**: Agencia Internacional para el Estudio del Cáncer.
4. **SEER**: Programa de Vigilancia Epidemiología y Resultados Finales.
5. **NSCLC**: Cáncer de pulmón de células no pequeñas.
6. **SCLC**: Cáncer de pulmón de células pequeñas.
7. **CAAX**: Motivo de aminoácidos, C de Cisteína, A de aminoácido alifático y X de cualquier aminoácido.
8. **ADN**: Ácido Desoxirribonucleico.
9. **IGF-1**: Factor de Crecimiento tipo Insulina 1.
10. **NF 1**: Neuro Fibromatosis tipo 1.
11. **NNK**: Nitrosamina derivada de Nicotina.
12. **CHRNA2**: gen codificante de una subunidad del receptor neuronal nAChR.
13. **RTEL1**: Regulador 1 de la longitud de los telómeros.
14. **GAP**: Proteína asociada a GTPasas.
15. **GTP**: Trifosfato de Guanosina.
16. **GDP**: Difosfato de Guanosina
17. **GEF**: Intercambiadores de GTPs.
18. **CDDP**: Cisplatino
19. **DMSO**: Dimetil Sulfóxido
20. **ATCC**: Organización Americana de colección de cultivos
21. **dTMP**: Timidilato
22. **dNTPs**: Nucleótidos
23. **PD-1**: Receptor de muerte programada
24. **PDL-1**: Ligando del receptor de muerte celular programada
25. **BRCA1**: Gen de Susceptibilidad a Cáncer de Mama 1.
26. **BRCA2**: Gen de Susceptibilidad a Cáncer de Mama 2.
27. **MHC-1**: Complejo Mayor de Histocompatibilidad 1.
28. **NK**: Células asesinas naturales.
29. **GMPc**: Monofosfato de Guanosina cíclico.

30. **PGK1**: Enzima Fosfoglicerato Cinasa 1.
31. **PDHK1**: Enzima Piruvato deshidrogenasa Cinasa.
32. **PDH**: Enzima Piruvato Deshidrogenasa.
33. **P8**: Compuesto 2-[4-(3-clorofenil)-piperazina-1-il]-N-[(4R)-croman-4-il]acetamida.
34. **C14**: compuesto 2-[(3-clorofenil)-metil-metil-amino]-N- croman-4-il-acetamida.
35. **PBS**: Buffer Fosfato Salino.
36. **MTT**: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.
37. **NFT**: gen Factor Nuclear 1.
38. **RITI**: gen Tipo Ras sin motivo CAAX.
39. **Gprc5a**: gen de la Proteína 3 Inducida por el ácido retinoico.
40. **NNK**: Nitrosamina cetona derivada de la Nicotina.
41. **APCs**: Célula presentadora de antígeno.

2. Introducción

2.1. Generalidades de pulmón

Los pulmones son dos órganos esenciales del sistema respiratorio humano que se encuentran en el tórax flanqueando el corazón, están protegidos por la caja torácica además de estar recubiertos por una membrana serosa llamada pleura y se encuentran separados por el mediastino como se observa en la **figura 1** (Drake *et al.*, 2010).

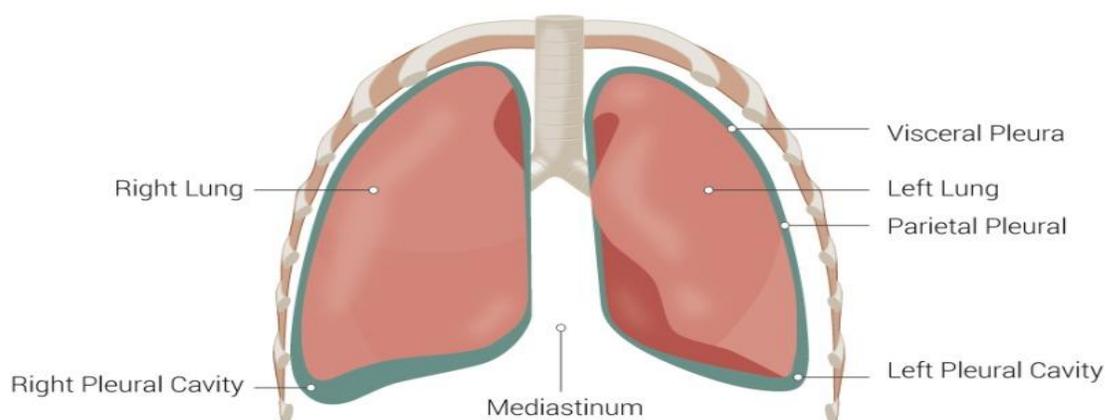


Figura 1 Organización general de los pulmones.

Organización de los pulmones indicando las regiones que lo flanquean. (figura modificada de Chaudhry R & Bordoni B., 2022).

La función principal del pulmón es permitir el intercambio de gases externos principalmente O_2 y CO_2 hacia el torrente sanguíneo, este proceso se realiza en pequeñas estructuras llamadas alvéolos (Haddad M & Sharma S., 2022).

Cada pulmón se divide en lóbulos que están separados por estructuras de tejido conectivo llamadas fisuras. El pulmón derecho tiene tres lóbulos: superior, medio e inferior, mientras que el pulmón izquierdo tiene dos lóbulos: superior e inferior. La fisura oblicua divide el pulmón derecho en lóbulos superior e inferior, mientras que la fisura horizontal separa el lóbulo superior del pulmón derecho en lóbulos superior y medio como se observa en la **figura 2** (Chaudhry R & Bordoni B., 2022).

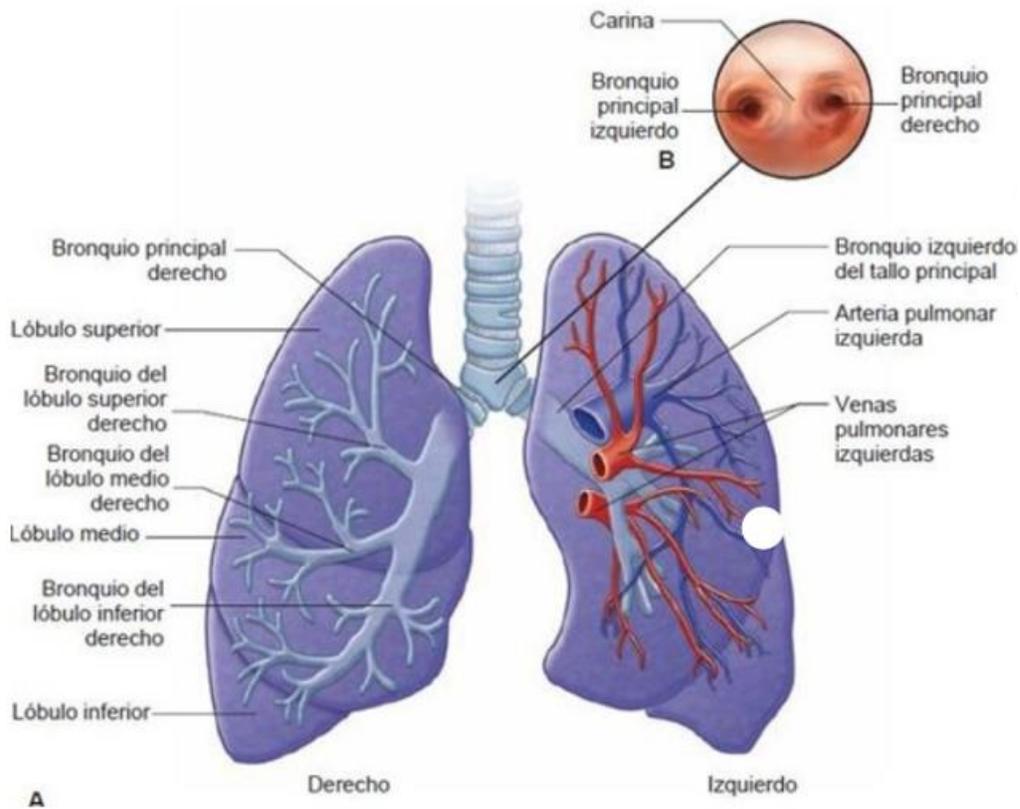


Figura 2 Sección transversal de la tráquea que ilustra su relación con los pulmones.

La imagen muestra un corte transversal de la tráquea en la imagen superior, en la imagen inferior se muestran ambos pulmones conectados a la tráquea, el pulmón izquierdo se divide en 3 lóbulos (superior, medio e inferior) también muestra cómo se ramifican los bronquios por dentro. El pulmón derecho muestra la distribución de las venas y las arterias al igual que la división entre lóbulo superior e inferior (modificado de Enfermería.Top).

La estructura básica del pulmón incluye a los bronquios, bronquiolos y alvéolos; Los bronquios son tubos grandes y rígidos que se ramifican desde la tráquea hasta los bronquiolos, los bronquiolos son estructuras tubulares de menor diámetro que los bronquios y son más flexibles; estos se dividen en bronquiolos terminales y luego en bronquiolos respiratorios, que se conectan a los alvéolos, por último, los alvéolos se encargan del intercambio gaseoso (Drake *et al.*, 2010).

2.1.1. Células implicadas en cáncer de pulmón

Existe una gran variedad de células que participan en el funcionamiento correcto del pulmón, sin embargo, algunas de esas células pueden ser blanco de sustancias exógenas que ocasionan mutaciones en su genoma y por consiguiente el desarrollo de cáncer en pulmón, a continuación, se mencionan algunas de las

células que pueden desarrollar cáncer de pulmón y su localización se puede observar en la **figura 3** (Altorki *et al.*, 2019).

Neumocitos tipo I: Células pequeñas y escamosas en donde ocurre el intercambio gaseoso, se unen a otras células alveolares mediante uniones estrechas para limitar el flujo de líquido (Brandt FP & Mandiga P., 2022).

Neumocitos tipo II: Células epiteliales que recubren los alvéolos y son responsables de la producción de surfactante pulmonar, una sustancia que reduce la tensión superficial en los alvéolos y ayuda a prevenir el colapso pulmonar (Bingle L *et al.*, 1990).

Células de Goblet: Células que tienen como función principal secretar moco compuesto principalmente por mucina. Este moco gracias a su consistencia permite capturar patógenos o partículas que posteriormente serán eliminadas por expulsión (Khan YS & Lynch DT., 2022).

Células ciliadas: Células que se encuentran en el epitelio del tracto respiratorio y poseen cilios que se mueven coordinadamente en forma de ondas. Este movimiento ayuda en el transporte del moco hacia la tráquea para su posterior eliminación (Khan YS & Lynch DT., 2022).

Células endoteliales: Células que recubren los vasos sanguíneos del pulmón y son responsables de la transferencia de oxígeno y dióxido de carbono entre la sangre y el aire en los alvéolos. También desempeñan un papel en la regulación del flujo sanguíneo pulmonar y la respuesta a la hipoxia (Sun X *et al.*, 2021).

Células del músculo liso: Células musculares que se encuentran en las paredes de las vías respiratorias y los vasos sanguíneos del pulmón. Estas células dependen de las concentraciones de Ca^{2+} para su función y son responsables de la contracción y relajación de las vías respiratorias y los vasos sanguíneos, lo que ayuda a regular el flujo de aire y sangre en los pulmones (Bai Y *et al.*, 2007).

Células neuroendocrinas: Células que se encuentran en los pulmones y que tienen características tanto neuronales como endocrinas. Tienen características quimio sensitivas y funcionan como componentes sensoriales del pulmón. También

pueden formar clúster de células “NEBs” y tienen propiedades de células madre (Noguchi M *et al.*, 2021).

Células mesenquimales: Células del tejido conjuntivo que se encuentran en el pulmón y que tienen la capacidad de diferenciarse en una variedad de células diferentes, como fibroblastos, células musculares y células del sistema inmunológico. Estas células desempeñan un papel importante en la reparación y regeneración del tejido pulmonar después de una lesión o inflamación (Nasari A *et al.*, 2021).

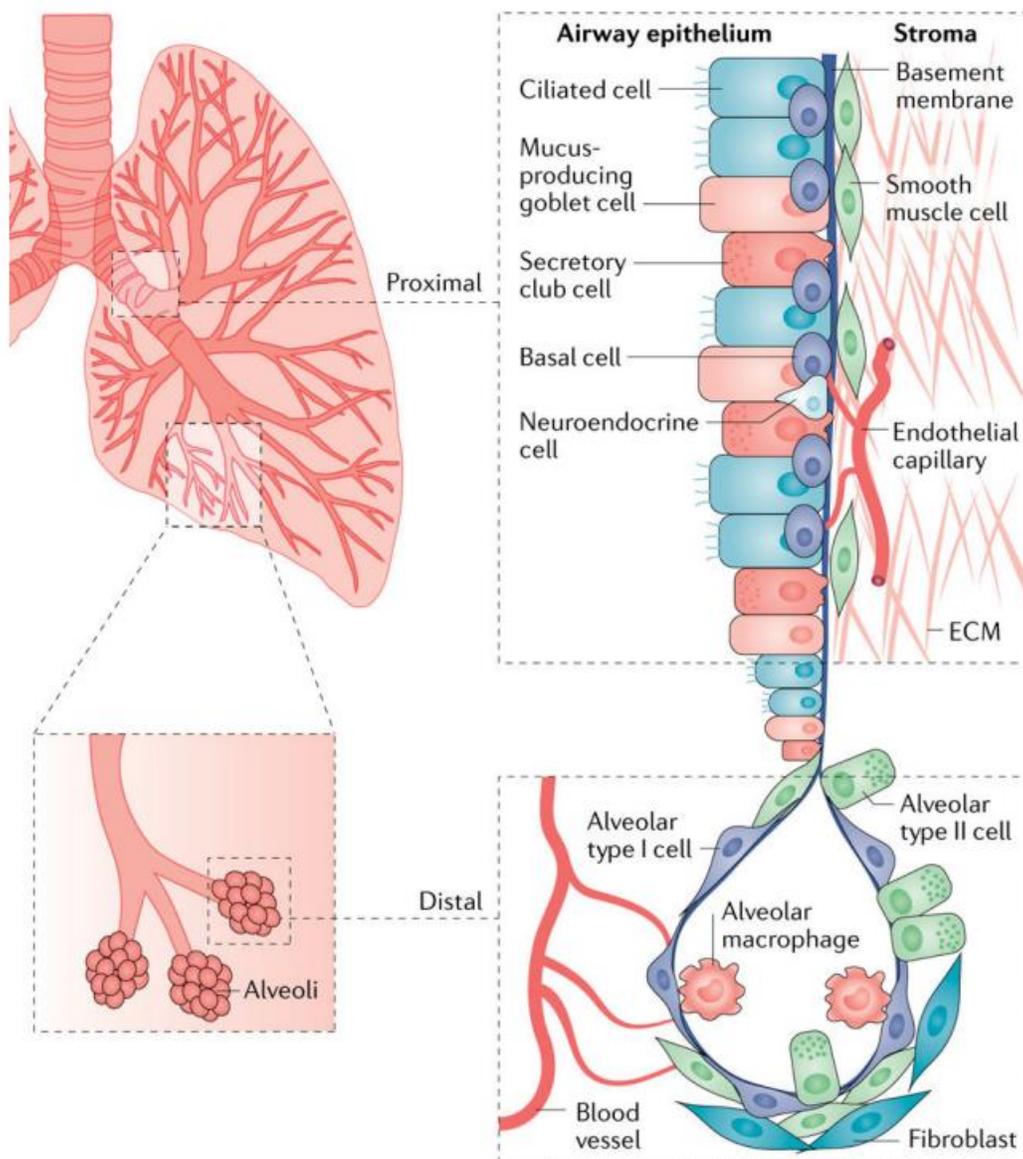


Figura 3 Microambiente en el pulmón.

En la imagen se observa la distribución de las células que dan la estructura y función al pulmón de las cuales pueden surgir tumores, La imagen distingue dos regiones del pulmón, la proximal en donde se localiza el epitelio respiratorio junto al estroma y las células que lo componen. La región distal en donde se localizan los alveolos y las células que lo constituyen (modificado de Altorki et al., 2019)

2.2. Factores de Riesgo

Existen diversos factores de riesgo externos y conductas personales que pueden provocar un aumento en la probabilidad de desarrollar cáncer de pulmón, este aumento en la probabilidad está estrechamente relacionado con el tiempo de exposición que tiene una persona con los siguientes factores de riesgo: Tabaquismo, exposición al humo de segunda mano, exposición a contaminantes en el aire, comorbilidades, etc. (Hecht SS, 1999).

El tabaquismo es el principal factor de riesgo para el cáncer de pulmón siendo responsable de aproximadamente el 80% de los casos, ya que el humo del tabaco contiene numerosos componentes químicos mostrados en la **Tabla 3** como la Nicotina Alquitrán, etc., que pueden causar daño en el ADN de las células pulmonares de manera directa o indirecta y desencadenar el desarrollo del cáncer (Hecht SS, 1999).

Algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos son metabolizados por las células convirtiéndose en carcinogénicos ya que pueden formar abductos, estos compuestos se tratan de eliminar por vías de desintoxicación y cuando el balance entre intoxicación y desintoxicación se rompe promueve el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón (Hecht SS, 1999).

Compuestos en el cigarro	Propiedades dañinas
Alquitrán	Contiene una mezcla de compuestos tóxicos y cancerígenos.
Nicotina	Adictiva y estimula la proliferación celular junto a la formación de nuevos vasos sanguíneos que alimentan al tumor.

Monóxido de carbono	Disminuye el suministro de oxígeno a los tejidos y promueve la hipoxia celular.
Metales pesados	Tóxicos y pueden afectar la función celular.
Nitrosaminas y otros compuestos químicos.	Pueden dañar el ADN y provocar mutaciones.

Tabla 1 Compuestos que componen al cigarro de tabaco.

En la tabla se muestran los diferentes componentes que están presentes en los cigarrillos, así como los efectos nocivos de cada compuesto.

La exposición al humo de segunda mano, también conocido como humo ambiental de tabaco, es una forma de tabaquismo pasivo que se produce cuando se inhalan los productos químicos tóxicos mostrados en la **Tabla 3** como el monóxido de carbono, nicotina, etc., que se liberan al quemar cigarrillos de tabaco por otra persona. Esto puede ocurrir en entornos cerrados, como hogares, vehículos, lugares de trabajo, restaurantes y bares, donde se permite fumar (Kalandidi A *et al.*, 1990).

La exposición a contaminantes del aire mostrados en la **Tabla 4** como el ozono, material particulado, etc., es otro factor de riesgo importante para el cáncer de pulmón. Los contaminantes del aire son sustancias químicas o partículas en el aire que pueden ser inhalados y pueden dañar el tejido pulmonar (Li D *et al.*, 2023). Algunos de los contaminantes del aire que se han asociado con un mayor riesgo de cáncer de pulmón incluyen:

Contaminantes	Descripción
Material particulado	Pequeñas partículas de polvo, suciedad u hollín suspendidas en el aire con un diámetro de 2.5 micrómetros que les permite penetrar profundamente en los pulmones y dañar las células.

Ozono	Gas que se forma en la atmosfera, aunque también lo emiten las combustiones de materiales fósiles que tienen los automóviles, las fábricas, etc., esta condición permite una constante exposición en la vida cotidiana urbana.
Dióxido de nitrógeno	Gas emitido por la quema de combustibles fósiles.
Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)	Sustancias formadas por la quema de materiales orgánicos como la madera o el carbón.
Radón	Gas radioactivo presente en el subsuelo que puede filtrarse hacia los edificios

Tabla 2 Contaminantes dañinos presentes en el aire que respiramos y que dañan a las células en los pulmones.

Una dieta saludable y equilibrada puede reducir el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón. Los estudios han demostrado que una dieta rica en frutas, verduras y cereales integrales puede ayudar a reducir el riesgo de cáncer de pulmón. Por otro lado, una dieta rica en grasas saturadas, carnes rojas y procesadas se ha asociado con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de pulmón (Wang C *et al.*, 2022).

El cáncer de pulmón también puede estar asociado a ciertas comorbilidades o enfermedades coexistentes que aumentan el riesgo de desarrollar la enfermedad o el riesgo de mortalidad. A continuación, se mencionan algunas:

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) es una enfermedad pulmonar crónica caracterizada por una obstrucción de las vías respiratorias, lo que hace que sea difícil respirar y es causada principalmente por tabaquismo, por sí misma puede aumentar el riesgo de cáncer de pulmón, incluso en personas que nunca han fumado (de Torres JP *et al.*, 2011).

En pacientes con Enfermedades Cardio Vasculares (ECV), especialmente cardiopatías y vasculopatías, se ha observado un mayor riesgo de incidencia de cáncer de pulmón ya que ambas enfermedades comparten los mismos factores de riesgo lo cuales son: Tabaquismo, diabetes, obesidad, entre otras, también se ha reportado que pacientes con cáncer de pulmón y ECV presentan mayor mortalidad a causa de que muchos tratamientos para cáncer de pulmón no los pueden recibir las personas con ECV (Wang C *et al.*, 2022).

La diabetes es una afección crónica en la que el cuerpo no puede producir o utilizar adecuadamente la insulina. Se ha demostrado que las personas con diabetes tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer de pulmón debido al daño en el ADN ocasionado por el estrés oxidativo. También esta enfermedad genera un microambiente inflamatorio lo que afecta la respuesta de las células del sistema inmune, adicionalmente el uso excesivo de insulina puede aumentar los niveles de expresión del factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1) y favorecer el desarrollo de cáncer mediante la activación de la vía de señalización IGF involucrada en proliferación, supervivencia e invasión (Rey-Reñones C *et al.*, 2021) (Fidler MJ *et al.*, 2012).

La Enfermedad Renal Crónica (ERC) es una afección en la que los riñones no pueden filtrar adecuadamente los desechos de la sangre. Un metaanálisis de 18 estudios encontró una asociación significativa entre la ERC y un mayor riesgo de mortalidad cuando se presenta cáncer de pulmón en comparación con la población general, con un riesgo relativo de 1.37, esto se debe al empeoramiento ERC por las quimioterapias o cirugías que se emplean en cáncer de pulmón (Liu L *et al.*, 2020).

2.3. Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón comienza con una célula del epitelio pulmonar que ha sufrido mutaciones en genes como Ras, p53, EGFR, ROS1-ALK, STK11 entre otros que están involucrados en supervivencia, crecimiento, migración, evasión del sistema inmune, diferenciación, etc., por medio de la activación de vías como la vía de las MAPK, AKT/mTOR, JAK/STAT, NF- κ B, etc. Esto ocasiona una desregulación en su ciclo de vida y le otorga a la célula la capacidad de proliferar descontroladamente e ir acumulando mutaciones adicionales (Hausman DM, 2019).

Ya que la célula tiene las mutaciones necesarias para crecer, proliferar y evitar al sistema inmune, comienza a generar un cúmulo de células con una gran diversidad de mutantes en lo que se denomina tumor. En el caso de cáncer de pulmón el tumor se desarrolla en los pulmones y con el paso del tiempo el tumor va creciendo en masa e invadiendo tejidos aledaños. (Roerink SF *et al.*,2018).

A medida que crece más el tumor, este va modificando las condiciones del microambiente a su favor hasta que alcanza el sistema linfático o sanguíneo y mediante un proceso celular comienza la transición epitelio-mesenquimal para poder viajar a través de esos sistemas y colonizar otros órganos como cerebro, hueso, hígado, etc. (Chmielik E *et al.*, 2018).

2.4. Epidemiología del cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es una de las neoplasias más prevalentes y mortales a nivel mundial, siendo responsable del 18% de todas las muertes por cáncer tanto en hombres como en mujeres (Bade BC *et al.*, 2020). Según estadísticas del año 2020 hechas por IARC “International Agency for Research on Cancer” se estima que en todo el mundo se presentaron aproximadamente 2.2 millones de casos nuevos de cáncer de pulmón y 1.8 millones de muertes relacionadas con esta enfermedad (Sharma R, 2022).

Estimated number of new cases in 2020, Mexico, both sexes, all ages Estimated number of deaths in 2020, Mexico, both sexes, all ages

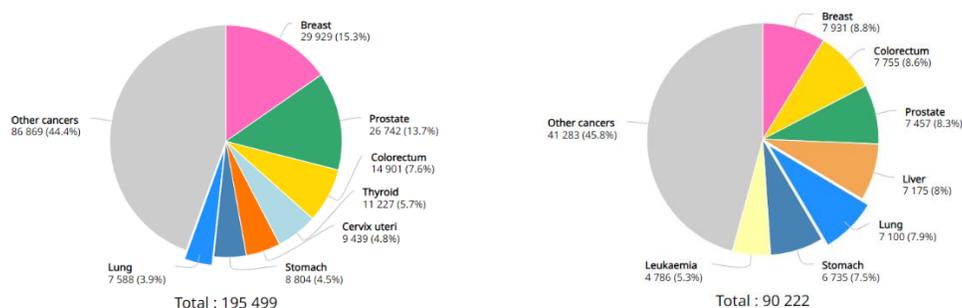


Figura 4 Incidencia y mortalidad en México de cáncer de pulmón.

En la imagen izquierda se puede observar que el cáncer de pulmón se encuentra en la séptima posición en cuanto a incidencia mientras que en la imagen derecha se puede observar al cáncer de pulmón en el quinto lugar en cuanto a mortalidad y tomando ambos valores numéricos se encuentran casi idénticos por lo que aproximadamente el 90% de los casos nuevos mueren (información obtenida y modificada de Globocan 2020).

Estimated number of new cases in 2020, World, both sexes, all ages Estimated number of deaths in 2020, World, both sexes, all ages

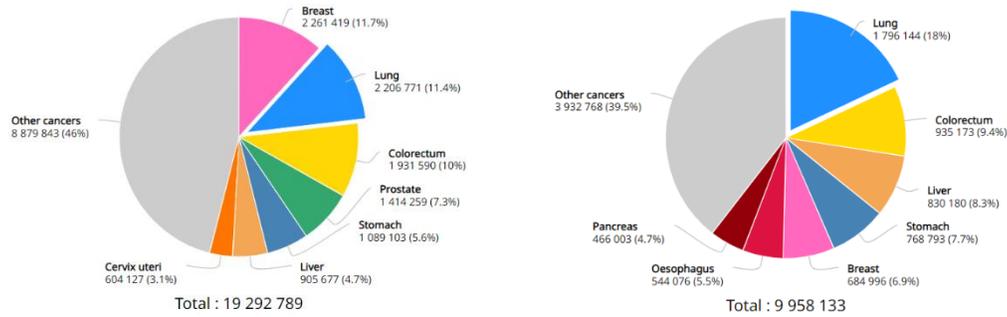


Figura 5 Incidencia y mortalidad a nivel mundial de cáncer de pulmón.

En la imagen izquierda se puede observar que el cáncer de pulmón se encuentra en la segunda posición en cuanto a incidencia mientras que en la imagen derecha se puede observar al cáncer de pulmón en el primer lugar en cuanto a mortalidad (información obtenida y modificada de Globocan 2020).

En el caso del cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC por sus siglas en inglés), con base en el programa de vigilancia, epidemiología y resultados finales (SEER por sus siglas en inglés) las tasas de supervivencia que manejan para personas con NSCLC son a 5 años después de ser diagnosticados y dependiendo del estadio del cáncer de pulmón las probabilidades de sobrevivir más de 5 años cambian como se observa en la **Tabla 1**, a mayor estadio menor es la probabilidad de supervivencia debido a que el tumor a partir del estadio 3 ha invadido casi todo el pulmón y en el cuarto estadio esta ya ha migrado a otros órganos y en cualquiera de los dos casos el pulmón ya está demasiado dañado, mientras que para cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC por sus siglas en inglés) las tasas de supervivencia son menores como se puede observar en la **Tabla 2**, esto se debe a que este tipo de cáncer es bastante agresivo y pasa inadvertido por lo que crece y migra con mayor rapidez que el de tipo NSCLC (American Cancer Society. Cancer Statistics Center. <http://cancerstatisticscenter.cancer.org>. Accessed June 26, 2023).

Con base el sistema SEER, los estadios del cáncer de pulmón son:

- Localizado; significa que no ha salido del pulmón.
- Regional; significa que ya migró hacia lugares cercanos como nodos linfáticos.
- Distante; significa que ya migró hacia otros órganos como cerebro, hueso, etc.

Estadio SEER	Tasa de supervivencia relativa a 5 años de NSCLC
Localizado- Etapa 1-2	65 %
Regional-Etapa 3	37%
Distante-Etapa 4	9 %
Combinación de todo	28 %

Tabla 3 Tasa de supervivencia en cáncer de pulmón de células no pequeñas con base al estudio SEER.

Estadio SEER	Tasa de supervivencia relativa a 5 años de SCLC
Localizado-Etapa 1-2	30 %
Regional-Etapa 3	18%
Distante-Etapa 4	3 %
Combinación de todo	7 %

Tabla 4 Tasa de supervivencia en cáncer de pulmón de células pequeñas con base al estudio SEER.

2.5. Tipos de cáncer de pulmón

Cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC).

Representa alrededor del 85% de los casos, las células que se ven afectadas son generalmente células epiteliales del revestimiento de los pulmones. Estas células pueden incluir células del epitelio bronquial y alveolar, así como células glandulares productoras de moco (Testa U *et al.*, 2018).

Se clasifican de la siguiente manera:

- **Adenocarcinoma (LUAD):** es el tipo más común de NSCLC, representando aproximadamente el 40% de los casos. Se origina en las células glandulares que secretan moco y otras sustancias. Predominan mutaciones somáticas en los que se identificaron 18 genes TP53 (46%), KRAS (33%), KEAP1 (17%), STK11 (17%), EGFR (14%), NF1 (11%), BRAF (10%), SETD2 (9%), RBM10 (8%), MGA (8%), MET (7%), ARID1A (7%), PIK3CA (7%), SMARCA4 (6%), RB1 (4%), CDKN2A (4%), U2AF1 (3%) y RIT1 (2%). dentro de estos destaca el gen K-Ras siendo la segunda mutación más frecuente (Inamura K *et al.*, 2015).

- **Carcinoma de células escamosas (LUSC):** representa alrededor del 25% de los casos de NSCLC. Se origina en las células planas y delgadas que recubren las vías respiratorias y a menudo está relacionado con el consumo de tabaco. Se caracteriza por mutaciones genómicas complejas y se han identificado 11 genes (Inamura K *et al.*, 2015).
- **Carcinoma de células grandes (LCC):** representa aproximadamente el 10-15% de los casos de NSCLC. Es un tipo poco común de cáncer de pulmón que se origina en células grandes y redondas (Travis WD, 2019).

Cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC)

Representa aproximadamente el 15% de los casos, crece en la región perihiliar con infiltración de submucosa bronquial y tejido peribronquial, las células afectadas son generalmente células neuroendocrinas que sufre mutaciones principalmente en p53 y RB1, estas células se encuentran en los bronquios y bronquiolos (Travis WD, 2019).

Se clasifica de la siguiente manera:

- **Carcinoma de células pequeñas (SCLC):** representa aproximadamente el 15% de los casos de cáncer de pulmón. Su tasa de crecimiento es muy rápida, es altamente agresivo y se propaga con facilidad hacia otros órganos, también se han encontrado mutaciones en NFI y RITI (Inamura K *et al.*, 2015).

En ambos tipos de cáncer de pulmón, también pueden estar presentes células inflamatorias y células del sistema inmunológico, que tratan de combatir el crecimiento del tumor mediante la destrucción de las células tumorales por acción de las células NK, infiltración de células T al tumor que inducen la muerte celular, presentación de antígenos tumorales a las células dendríticas y APCs, etc., sin embargo, el microambiente que genera el tumor puede interferir con el funcionamiento de las células del sistema inmune, adicionalmente los factores de

riesgo pueden mantener un microambiente inmunosupresor en el pulmón (Bahreyni A *et al.*, 2023).

NSCLC	Bronchioalveolar stem cells[75]	<i>Kras</i> G12D + Naphthalene
	Bronchioalveolar stem cells[76]	<i>Gprc5a</i> -KO + NNK
	Alveolar type II cells[77], [78]	<i>Kras</i> G12D
	Alveolar type II cells[78]	<i>Kras</i> G12D + <i>Trp53</i> -KO
	Alveolar type II cells[78]	<i>EGFR</i> -L858R
	Alveolar type II cells[82]	<i>MYC</i> overexpression
	Alveolar type II cells[79]	<i>Trp53</i> -KO + <i>Rb1</i> -KO
	Club cells[82]	<i>MYC</i> overexpression
	Basal cells[81]	<i>Trp53</i> -KO + <i>Rb1</i> -KO + <i>Fgfr1</i> K656E
SCLC	Neuroendocrine cells[79]	<i>Trp53</i> -KO + <i>Rb1</i> -KO
	Neuroendocrine cells[82]	<i>MYC</i> overexpression
	Neuroendocrine cells[82]	<i>Trp53</i> -KO + <i>Rb1</i> -KO + <i>MYC</i> overexpression
	Alveolar type II cells[82]	<i>Trp53</i> -KO + <i>Rb1</i> -KO + <i>MYC</i> overexpression
	Alveolar type II cells[79]	<i>Trp53</i> -KO + <i>Rb1</i> -KO
	Club cells[82]	<i>Trp53</i> -KO + <i>Rb1</i> -KO + <i>MYC</i> overexpression
	Basal cells[81]	<i>Trp53</i> -KO + <i>Rb1</i> -KO
	Basal cells[81]	<i>Trp53</i> -KO + <i>Rb1</i> -KO + <i>Fgfr1</i> K656E

Tabla 5 Origen celular de diferentes tipos de cáncer de pulmón en modelos murinos.

La tabla muestra en la primera columna los dos tipos de cáncer que existen (NSCLC y SCLC), en la segunda columna se muestran las células en el pulmón que pueden desarrollar estos tipos de cáncer y en la tercera columna mencionan las mutaciones o tratamientos que tienen que sufrir cada linaje celular para que se conviertan en NSCLC o SCLC (modificado de Giaccone G & He Y., 2023).

En modelos murinos de NSCLC se encontró una relación entre los tipos de cáncer de pulmón y las mutaciones que permitían el desarrollo de ese tipo de cáncer de pulmón como se puede observar en la **Tabla 5**, observaron que tumores histológicamente diferenciados en NSCLC podían transformarse en SCLC si la misma clona obtenía mutaciones adicionales en genes clave como *Trp33*-KO y *RB1*-KO, adicionalmente el contacto con compuestos carcinogénicos como NNK o Naftaleno que son derivados de combustibles fósiles pueden generar el desarrollo cancerígeno si en la célula se encuentran genes mutados como *K-Ras*^{G12D} o *Gprc5a*-KO (Giaccone G & He Y., 2023).

2.6. Genética y progresión en cáncer de pulmón

Se han identificado una gran variedad de genes que pueden ser heredados y han sido asociados con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de pulmón como el gen del receptor colinérgico de nicotina CHRNA2, genes teloméricos como RTEL1 entre otros, sin embargo, estos estudios no han sido concluyentes en torno a que sean iniciadores del desarrollo de cáncer de pulmón. (Bade BC & De la Cruz CS, 2020).

Lo que si se puede afirmar es que el desarrollo de cáncer de pulmón esta estrechamente relacionado a la mutación en los genes que se presentan a continuación:

2.6.1. EGFR

Los receptores relacionados al factor de crecimiento epidérmico (EGFR) como lo son EGFR/HER1, c-erbB3/HER3, c-erbB4/HER4 y c-erb2/HER2 han sido encontrados sobre expresados en NSCLC en comparación con las células normales. Estos activan vías de señalización como RAS/ERK/MAPK, PI3K/AKT y STATS. Los exones que obtienen mutaciones son los exones 18, 19, 20 y 21. En algunos casos se puede producir un reordenamiento del gen ocasionando una deleción de los exones 2 al 7 que forman parte del dominio extracelular de EGFR llamado EGFRvIII lo que implica una activación constante. El efecto directo en la célula de la activación aberrante de estos receptores conlleva una mayor proliferación, supervivencia, crecimiento, migración y diferenciación por la activación de las vías antes mencionadas (Herbst RS *et al.*, 2018).

2.6.2. EML4-ALK

El oncogén EML4-ALK causa el 5 % del total de cánceres en NSCLC, esta proteína de fusión surge cuando se produce un reordenamiento cromosómico y se fusionan ambos genes la proteína asociada a microtúbulos equinodermus (EML4) y la proteína linfoma anaplásico cinasa (ALK), esta proteína de fusión es activada por las citocinas ALKAL1 y ALKAL2 resultando en la transmisión de la señalización intracelular hacia MAPK. Existen 4 variantes oncogénicas de EML4-ALK de las cuales las más comunes son: la variante 1 (EML exón 13 unido al exón 20 de ALK)

y la variante 3 (EML exón 6 unido al exón 20 de ALK). También encontraron que la proteína de fusión EML-ALK puede localizarse en otros compartimentos intracelulares de la célula y reclutar proteínas para generar señalizaciones oncogénicas en AKT/mTOR y JAK/STAT (Elshatlawy M *et al.*, 2023).

2.6.3. ROS1

ROS1 es una tirosina cinasa que al igual que ALK se vuelve oncogénica al tener una reordenación cromosómica en donde genera una proteína de fusión con otros genes como: RET, MET, EGFR, etc. Esta fusión la vuelve constitutivamente activa lo que activa una señalización por las vías de ERK/MAPK, JNK/STAT, PI3K/AKT, sin embargo, estas proteínas de fusión tienen poca incidencia que va desde el 1 % al 2 % en cáncer de pulmón (Chen J *et al.*, 2023).

2.6.4. p53

Es bien conocido que P53 es el guardián del genoma ya que está involucrado en apoptosis, arresto del ciclo celular y reparación del DNA. Se ha visto presente P53 mutado en los exones 2, 3, 4, 6, 7, 9, 10 y 11, algunas de estas mutaciones generan pérdida de función de p53, ganancia de función o pérdida de la proteína. Al igual que K-Ras no tiene epítomos que sea afectados por drogas o fármacos que restituyan su función. Existen 4 isoformas de la proteína p53; TAp53 es la forma completa, $\Delta 40p53$ carece de los primeros 39 aminoácidos, $\Delta 133p53$ carece de los primeros 132 aminoácidos y $\Delta 160p53$ carece de los primeros 159 aminoácidos, si estas isoformas sufren mutaciones en los exones antes mencionados, cambian el comportamiento de la proteína haciendo que p53 pierda su capacidad de unión al DNA, capacidad de interactuar con otras proteínas, su capacidad de evitar ser fosforilada, etc. Esto lleva a la progresión del ciclo celular, proliferación y supervivencia de las células cancerosas (Shen J *et al.*, 2023).

2.6.5. Ras

Ras es una familia de pequeñas GTPasas que inician una serie de cascadas de señalización río abajo cuando los receptores asociados son estimulados. Tres proteínas componen a esta familia las cuales son K-Ras, H-Ras y N-Ras, las tres comparten un dominio G con hasta un 90% de homología y donde difieren es en la región hipervariable, estas proteínas de la familia Ras están relacionadas a

se muestra la secuencia de aminoácidos en el extremo carboxilo a detalle de las proteínas HRAS, NRAS, KRAS4A y KRAS4B (imagen modificada de Simanshu DK et al., 2017).

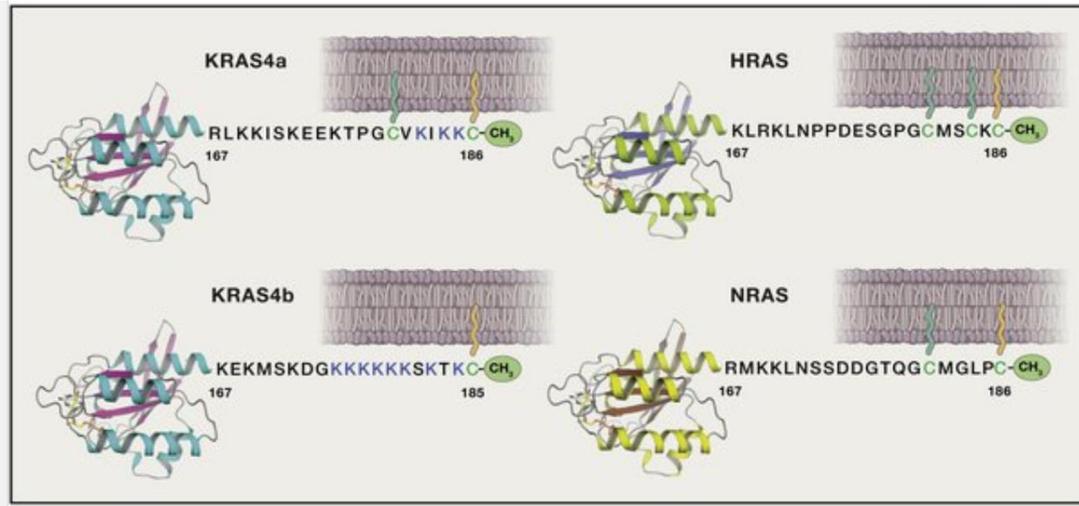


Figura 7 Asociación de los aminoácidos de la región carboxilo terminal con la membrana celular entre las diferentes isoformas de KRAS, NRAS y HRAS.

En la imagen se puede observar cómo cambia la secuencia de aminoácidos en el extremo carboxilo afectando su unión con la membrana celular entre KRAS4A, KRAS4B HRAS y NRAS (imagen modificada de Simanshu DK et al., 2017).

2.7. Diagnóstico del cáncer de pulmón

Un diagnóstico temprano es necesario para poder aumentar la probabilidad de curar o tratar el cáncer de pulmón, el problema en la actualidad es porque en la mayoría de los casos se detecta en estado tardío lo cual lleva al peor desenlace (Nooreldeen R & Bach H., 2021). Generalmente se realiza el diagnóstico de cáncer de pulmón mediante una combinación de pruebas y exámenes, algunos síntomas como tos persistente, dolor en el pecho, dificultad para respirar y pérdida de peso inexplicable pueden sugerir la presencia de cáncer de pulmón y pueden ser evaluados mediante siete técnicas (Thakur SK et al., 2020):

- Radiografía de tórax: es la prueba inicial de detección que puede detectar una masa anormal en el pulmón.
- Tomografía computarizada (TC) de tórax: es una prueba más precisa que puede detectar tumores más pequeños y proporcionar información detallada sobre el tamaño, la ubicación y la extensión del tumor.

- Biopsia: es la confirmación definitiva del cáncer de pulmón. Se pueden obtener muestras de tejido del tumor mediante una variedad de técnicas, como una biopsia con aguja guiada por TC o una broncoscopia.
- Análisis de sangre: se pueden realizar pruebas de sangre para detectar la presencia de marcadores tumorales en la sangre, como el antígeno carcinoembrionario (CEA) cuyos valores normales son < 5ng/ml y valores > a 10 ng/ml indican posible desarrollo tumoral, la proteína asociada al cáncer de pulmón (LDH) cuyos valores normales oscilan de entre 105 – 333 U/L, el fragmento de citoqueratina 21-1 (CYFRA 21-1) cuyos valores normales son < 3.2 µg/L, entre otros marcadores.
- Evaluación de la función pulmonar: puede ser útil para evaluar la capacidad de los pulmones para respirar y determinar el mejor curso de tratamiento.

2.8. Tratamiento contra el cáncer de pulmón

El tratamiento para cáncer de pulmón depende de varios factores, como el tipo y estadio del cáncer, la edad y la salud general del paciente. Los tratamientos más comunes incluyen cirugía, radioterapia, quimioterapia, terapia dirigida e inmunoterapia. En el caso de cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), la mayoría de los pacientes reciben quimioterapia y radioterapia (Lahiri A *et al.*, 2023).

Para el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), el tratamiento varía según el estadio y el subtipo del cáncer. Entre los estadios 1 y 2 es la mejor opción de tratamiento. En estadios más avanzados, se puede utilizar radioterapia, quimioterapia, terapia dirigida o inmunoterapia, o una combinación de estos tratamientos (Spiro SG & Silvestri GA., 2005).

2.8.1. Cirugía

La cirugía es el tratamiento más común para el cáncer de pulmón en estadio temprano con una tasa de supervivencia mayor a 5 años de hasta 90% [Lung-Sparing Surgery Effective for Early-Stage Lung Cancer - NCI](#) siendo el mejor tratamiento para los estadios 1 y 2, este tratamiento consiste en extirpar el tumor y una parte del tejido pulmonar circundante (Spiro SG & Silvestri GA., 2005). Gracias al uso de screening programs es más fácil el diagnóstico y la intervención temprana, también el uso de la robótica ha ayudado mucho en este campo como lo es el uso

de Video-assisted thoracoscopic surgery (VATS) y robotic-assisted thoracoscopic surgery (RATS) (Montagne F *et al.*, 2021).

- a) La neumonectomía es una cirugía en la que se extirpa todo un pulmón. Esta cirugía puede ser necesaria si el tumor se encuentra cerca del centro del pecho y no se puede extirpar solo una parte del pulmón (Montagne F *et al.*, 2021).
- b) La lobectomía es una cirugía en la que se extirpa todo un lóbulo del pulmón que contiene el tumor. Esta es la cirugía preferida en la manera de lo posible, ya que se conserva más tejido pulmonar sano (Montagne F *et al.*, 2021).
- c) La segmentectomía o resección en cuña son cirugías en las que se extirpa solo una parte del lóbulo pulmonar afectado por el tumor (Wang L *et al.*, 2022).

2.8.2. Radioterapia

La radioterapia utiliza radiación de alta energía para matar células cancerosas y reducir el tamaño de los tumores. La radioterapia puede ser externa o interna (braquiterapia) y se utiliza en diferentes etapas del cáncer de pulmón (Spiro SG & Silvestri GA., 2005). Existen diferentes tipos de radio terapias como: Radioterapia Ablativa Estereotáctica (SBRT), Radioterapia Conformada Tridimensional (3D-CRT), Radioterapia de Intensidad Modulada (IMRT), Terapia de Aro Volumétrico Modulada (VMAT) y Radiocirugía Estereotáctica (SRS) (Zhu Z *et al.*, 2022).

2.8.3. Quimioterapia

La quimioterapia utiliza fármacos para matar las células cancerosas, aunque tiene bastantes efectos secundarios como náuseas, vómito, fatiga, mayor riesgo de padecer infecciones, entre otros. Puede ser administrada por vía intravenosa o por vía oral y se utiliza en diferentes etapas del cáncer de pulmón (Spiro SG & Silvestri GA., 2005).

Antes de la cirugía (quimioterapia neoadyuvante): La quimioterapia neoadyuvante puede utilizarse (a veces con radioterapia) para intentar reducir el

tamaño de un tumor para extirparlo con una cirugía menos extensa cuando se presenta NSCLC (Abidi et al., 2023).

Después de la cirugía (quimioterapia adyuvante): Puede utilizarse quimioterapia adyuvante (a veces con radioterapia) para intentar eliminar cualquier célula cancerosa que pueda haber quedado o que se haya extendido pero que no puede verse ni siquiera en las pruebas de imagen cuando se presente NSCLC (Abidi et al., 2023).

Drogas utilizadas

- **Cisplatino (CDDP):** El cisplatino funciona interfiriendo con el ADN de las células cancerosas, lo que provoca daño en su estructura y evita su crecimiento y proliferación (Zoñ A & Bednarek I, 2023). Es común el uso de quimioterapias basadas en este compuesto como primera opción, sin embargo, tiene altos efectos citotóxicos y genotóxicos hacia las células sanas y las células cancerosas generan resistencia muy rápido (Zhong T *et al.*, 2023). Tiene una tasa de respuesta de entre 25% a 30% y la vigilancia federal ha detectado algunos efectos secundarios como: ototoxicidad, nefrotoxicidad, vomito, mielosupresión, neuropatía periférica, etc.
- **Carboplatino:** Es un derivado del cisplatino, por lo tanto, tiene un mecanismo similar al cisplatino el cual sería la formación de abductos en el ADN, este compuesto es menos toxico que el cisplatino, pero también las células cancerosas generan resistencia contra el carboplatino (Rabik CA & Dolan ME, 2007). Tiene una tasa de respuesta de entre 20% a 30% y la vigilancia federal ha detectado algunos efectos secundarios como: nauseas, vomito, neuropatía periférica, mielosupresión, fatiga, etc.
- **Paclitaxel (Taxol):** Actúa impidiendo la división celular al estabilizar los microtúbulos, estructuras necesarias para el crecimiento y la segregación de los cromosomas durante la división celular, arresta en la fase G2/M a las células en división lo que lleva a la inevitable muerte, aunque células cancerosas han encontrado vías de escape y generan resistencia (Gallego-Jara J *et al.*, 2020). Tiene una tasa de respuesta de entre 20% a 30% y la vigilancia federal ha detectado algunos efectos secundarios como:

reacciones de hipersensibilidad, alopecia mielosupresión, dolor muscular, neuropatía periférica, etc.

- **Docetaxel:** Al igual que el paclitaxel, el docetaxel también estabiliza los microtúbulos en las células cancerosas, interrumpiendo su división y crecimiento al arrestar a las células en fase G2/M (Muniyan S *et al.*, 2020). Tiene una tasa de respuesta de entre 7% a 10% cuando se utiliza como segunda opción, también la vigilancia federal ha detectado algunos efectos secundarios como: mielosupresión, estomatitis, alopecia, retención de líquidos, etc.
- **Gemcitabina (Gemzar):** Es un fármaco que tiene 3 vías efectoras, en la primera inhibe a la enzima ribonucleótido reductasa que es esencial para la síntesis de dNTPs, en la segunda actúa como un señuelo que sustituye a la citidina al momento de la síntesis de ADN y la tercera promueve la apoptosis: estas tres vías llevan a la muerte celular pero las células cancerosas generan resistencia rápidamente (Coyne CP & Narayana L., 2016). Tiene una tasa de respuesta de entre 20% a 30% en combinación con cisplatino. La vigilancia federal ha detectado algunos efectos secundarios como: erupciones cutáneas, edema, erupciones en la piel, fiebre, vomito, náuseas, etc.
- **Vinorelbina (Navelbine):** Actúa uniéndose a la tubulina inhibiendo la formación de microtúbulos lo que arresta a las células en la transición de la metafase y anafase (Hastie R *et al.*, 2018). Tiene una tasa de respuesta de entre 20% a 25% en combinación con cisplatino o carboplatino. La vigilancia federal ha detectado algunos efectos secundarios como: mielosupresión, estreñimiento, fatiga, náuseas, neuropatía periférica, etc.
- **Etopósido (VP-16):** Es un fármaco que se intercala entre los cortes del ADN por la Topoisomerasa II, estabiliza el complejo que se forma y evita la ligación del ADN, esto va generando rupturas en el ADN (Infante Lara L *et al.*, 2018). Tiene una tasa de respuesta de entre 60% a 70% principalmente en SCLC. La vigilancia federal ha detectado algunos efectos secundarios como: mielosupresión, estomatitis, fatiga, náuseas, vomito, estreñimiento, neuropatía feriférica, etc.

- **Pemetrexed (Alimta):** Es un inhibidor de la enzima timidilato sintetasa, que es necesaria para la síntesis de dTMP, aunque se ha visto que también inhibe la enzima AICART que es necesaria para la síntesis de purinas (Booth L *et al.*, 2016). Tiene una tasa de respuesta de entre 30% a 40% en combinación con cisplatino. La vigilancia federal ha detectado algunos efectos secundarios como: mielosupresión, erupciones cutáneas, vomito, fatiga, náuseas, estomatitis, etc.

En el caso del cáncer de pulmón en células pequeñas (SCLC) tiene una prognosis fatal, esto debido a que es altamente agresivo, es difícil de detectar y los tratamientos son limitados: se utiliza quimioterapia junto a la radioterapia y los fármacos que se emplean son: (cisplatino + etopósido) o (carboplatino + etopósido) con una tasa de respuesta de entre 60 a 70% (Lahiri A *et al.*, 2023).

2.8.4. Terapia dirigida

La terapia dirigida es un tipo de tratamiento que se enfoca en identificar y atacar ciertas moléculas específicas en las células cancerosas. A diferencia de la quimioterapia, que puede dañar tanto las células cancerosas como las células normales en el cuerpo, las terapias dirigidas están diseñadas para tener como objetivo las células cancerosas y minimizar el daño a las células sanas (Assi HI *et al.*, 2023).

A continuación, se presentan algunos ejemplos de terapias dirigidas y los objetivos moleculares y vías que interrumpen:

Inhibidores de la tirosina quinasa: Estos fármacos se dirigen a las proteínas cinasas, que son responsables de la regulación de diversas vías de señalización celular (Liu P *et al.*, 2019). Los tres fármacos mencionados posteriormente son pequeñas moléculas.

- **Erlotinib, afatinib, gefitinib:** Estos fármacos inhiben la proteína cinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), interrumpiendo la vía de señalización EGFR/ERK (Ayeni D *et al.*, 2019). Tiene una tasa de respuesta hasta de 70% con una supervivencia sin progresión de la enfermedad de hasta 11 meses (Masri *et al.*, 2018), la vigilancia federal ha

detectado algunos efectos secundarios como: prurito, erupciones cutáneas, fatiga, diarrea, vomito, etc.

- **Lorlatinib:** Este fármaco inhibe la cinasa anaplásica linfoma de células grandes (ALK) y a la proteína de fusión EML4-ALK, interrumpiendo la vía de señalización ALK/STAT3 (Liu P *et al.*, 2019). Actualmente en el estudio CROWN hasta el 60% de pacientes han superado los 5 años sin progresión de la enfermedad (Solomon BJ *et al.*, 2024), la vigilancia federal ha detectado algunos efectos secundarios como: neuropatía periférica, edema, fatiga, aumento de peso, etc.
- **Alectinib:** Este fármaco inhibe la cinasa anaplásica linfoma (ALK) en cáncer de pulmón con mutaciones en esta proteína, interrumpe la vía de señalización ALK/STAT3. En un estudio se encontró una supervivencia sin progresión de la enfermedad de hasta 90.2 meses y los efectos secundarios de este tratamiento involucran constipación y daño temprano al riñón (Peter S *et al.*, 2017).
- **Imatinib:** Este fármaco inhibe la quinasa del receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFR- β) y c-Kit, interrumpiendo la vía de señalización PDGFR/PI3K, MAPK, STAT3; estas vías tienen un efecto sobre la proliferación, supervivencia, quimiotaxis, etc. (Kadivar A *et al.*, 2017). Un estudio en pacientes mayores a 70 años resulto en una tasa de respuesta de 32% junto a una supervivencia sin progresión de la enfermedad de hasta 7.3 meses (Bauman JE *et al.*, 2012), la vigilancia federal ha detectado algunos efectos secundarios como: fatiga, diarrea, dolor abdominal nauseas, etc.
- **Crizotinib, entrectinib, repotrectinib:** Estos fármacos inhiben a la proteína de fusión ROS 1, esta proteína se genera entre la fusión del gen ROS 1 con las proteínas transmembranales SLC34A2 o CD74. Esta fusión permite el aumento en los niveles de este oncogen y permite la activación constitutiva de las vías de señalización MAPK, PI3K/AKT, STAT3 y VAV3 (Gendarne S *et al.*, 2022). En el estudio TRIDENT-1 los participantes mostraron una tasa de supervivencia sin progresión de la enfermedad hasta de 36 meses (Drilon *et al.*, 2024). La vigilancia federal ha detectado algunos efectos secundarios

como: edema, trastornos hepáticos, visuales y respiratorios, fatiga, vomito, etc.

Inhibidores de la angiogénesis: Estos fármacos se dirigen a factores de crecimiento y receptores implicados en la formación de vasos sanguíneos con el fin de combatir la metástasis de las células cancerosas y evitar la expansión del tumor al privarlo de nutrientes (Yu J *et al.*, 2016).

- **Bevacizumab:** Es un anticuerpo monoclonal recombinante humanizado que se dirige contra el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), interrumpiendo la vía de señalización VEGF/VEGFR (Haunschild CE & Tewari KS, 2020). Se ha reportado una tasa de supervivencia sin progresión de la enfermedad de 5.8 meses en pacientes con mutaciones en K-Ras (West HJ *et al.*, 2022). La vigilancia federal ha detectado algunos efectos secundarios como: hipertensión, proteinuria, hemorragias nasales, problemas gastrointestinales, riesgo de perforación intestinal, etc.
- **Ramucirumab:** Es un anticuerpo monoclonal humano que se dirige contra el receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR-2), interrumpiendo la vía de señalización VEGF/VEGFR (Llovet JM *et al.*, 2022) En un estudio en pacientes con cáncer de pulmón en etapa 4 se llevaron a cabo tratamientos combinados entre ramucirumab y decetaxel obteniendo una supervivencia sin progresión de la enfermedad hasta de 8.3 meses (Garon EB *et al.*, 2014). La vigilancia federal ha detectado algunos efectos secundarios como: hipertensión, proteinuria, estomatitis, diarrea, fatiga, riesgo de sangrado, infecciones, etc.

Inhibidores de la vía mTOR: Estos fármacos se dirigen a las proteínas que participan río abajo de la señalización celular por mTOR (Lee L *et al.*, 2018).

- **Everolimus:** Es un fármaco que se dirige contra la proteína cinasa mTORC1, interrumpiendo la vía de señalización mTOR/PI3K/Akt, se utiliza en Tumores neuroendocrinos (NETs) (Lee L *et al.*, 2018). En un estudio de fase 3 se trataron pacientes con cáncer de pulmón neuroendocrinos de etapas avanzadas en donde los resultados muestran una supervivencia sin progresión de la enfermedad hasta de 13.3 meses (Yao JC *et al.*, 2016). La

vigilancia federal ha detectado algunos efectos secundarios como: estomatitis, hipoglucemia, hiperglucemia, fatiga, infecciones, anemia, erupciones cutáneas, etc.

- **Sunitinib:** Es un fármaco que inhibe varias proteínas tirosina cinasa (Lee L *et al.*, 2018) y en estudios clínicos se ha encontrado una supervivencia sin progresión de la enfermedad hasta de 4.3 meses en pacientes con SCLC (Tanday S, 2015). La vigilancia federal ha detectado algunos efectos secundarios como: hipertensión, estomatitis, diarrea, fatiga, hipotiroidismo, mielosupresión, riesgo de sangrado, etc.

Inhibidores contra Ras: Estos fármacos son pequeñas moléculas que inhiben a Ras oncogénico ya sea impidiendo su transporte, activación, farnesilación entre otros. Es importante la búsqueda de nuevos compuestos que inhiban la señalización oncogénica de K-Ras4B debido a que en la clínica los tumores con mutaciones en esta proteína son muy agresivos y actualmente solo hay dos tratamientos aprobados por la FDA para su uso clínico.

- **Sotorasib:** Es un fármaco por la FDA que se utiliza en cáncer de pulmón con mutación de K-Ras^{G12C}, este se une a K-Ras y lo mantiene en su estado inactivo “GDP” la desventaja es que es específico de esa mutación y las células cancerosas puede generar resistencia al expresar K-Ras^{Q61H} o por la activación de vías no canónicas (Lee A, 2022). Se ha reportado un aumento en la supervivencia sin progresión de la enfermedad de hasta 7.8 meses en pacientes que han recibido previamente quimioterapia con cisplatino y presentan la mutación en K-Ras^{G12C} (se Langhen AJ *et al.*, 2023). La vigilancia federal ha detectado algunos efectos secundarios como: fatiga, dolor en articulaciones, tos, náuseas, diarrea, elevación de enzima hepáticas, etc.
- **Adagrasib:** Es un fármaco aprobado por la FDA que se utiliza en cáncer de pulmón con mutación en K-RasG12C, evita la activación de K-Ras oncogénico mediante la unión covalente del fármaco con el aminoácido cisteína, esta unión reduce la activación de ERK y AKT afectando las vías de señalización MAPK y AKT/MTOR. Se ha reportado una supervivencia sin progresión de la enfermedad de hasta 12.6 meses en pacientes que han

recibido quimioterapia e inmunoterapia (Janne PA *et al.*, 2022). La vigilancia federal ha detectado algunos efectos secundarios como: náuseas, fatiga, diarrea, vómito anemia, etc.

- **K-Ras inhibitor 11:** Es una pequeña molécula que se une de manera no covalente en K-Ras por lo que inhibe la señalización de ERK y AKT, actualmente solo se han demostrado sus efectos antineoplásicos *in vitro* (McCarthy MG *et al.*, 2019).
- **Deltarasin:** Esta pequeña molécula inhibe a la PDE6 al interactuar con el pocket hidrofóbico evitando la interacción entre K-Ras y PDE6, esto provoca afectaciones en las vías de señalización MAPK y AKT/MTOR. Actualmente se han demostrado sus efectos antineoplásicos *in vitro* tanto en líneas celulares de PDAC como de NSCLC con mutaciones en K-Ras (Shetu SA *et al.*, 2023).
- **MDC-1016:** Es un fosfolípido que interfiere en la localización de K-Ras oncogénico en la membrana plasmática, actualmente se ha evaluado su eficiencia en PDAC tanto *in vivo* como *in vitro* obteniendo una reducción en el crecimiento tumoral de 63% (Mackenzie GG *et al.*, 2013).
- **Simvastatin:** Es una estatina lipofílica que inhibe a las proteínas activadoras de Ras, actualmente se ha realizado ensayos de su efecto antineoplásico en cáncer de pulmón, próstata y mama. En cáncer de mama se observa la inducción de muerte por apoptosis al usar simvastatin (Rezano A *et al.*, 2021).
- **Avicin G:** Es una saponina derivada de la planta *Acacia Victoriae* que afecta la localización de K-Ras4B^{G12D} en la membrana plasmática al disminuir la cantidad de fosfatidilserina. Actualmente se ha evaluado en NSCLC y PDAC con mutaciones en K-Ras4B^{G12D} demostrando una supresión en el desarrollo tumoral (McCarthy MG *et al.*, 2019).
- **Prostain:** Es un éster derivado del árbol *Homalanthus nutans*, esta molécula inhibe la vía canónica Wnt/Ca²⁺. Actualmente se han probado sus efectos antineoplásicos en PDAC con mutantes de K-Ras4B^{G12V} y H-Ras^{G12V} (McCarthy MG *et al.*, 2019).
- **Lupeol:** Es un terpenoide que inhibe a la enzima FPTasa, actualmente se ha evaluado esta molécula en cáncer de pulmón con mutaciones en K-Ras^{G12S}

mostrando efectos antineoplásicos mediante la inhibición de la activación de ERK (Bhatt M *et al.*, 2021).

- **MRTX1133:** Es una pequeña molécula que inhibe selectivamente a K-Ras4B^{G12D} afectando las principales vías de señalización MAPK y AKT/MTOR. Se evaluó en PDAC con mutaciones en K-Ras^{G12D} demostrando un potente efecto antineoplásico tanto *in vivo* como *in vitro* (Wei D *et al.*, 2024).

2.8.5. Inmunoterapia

La inmunoterapia es un tipo de tratamiento que utiliza el sistema inmunológico del cuerpo para combatir el cáncer, se utilizan medicamentos que ayudan al sistema inmunológico a identificar y atacar las células cancerosas. La inmunoterapia se utiliza principalmente para tratar el cáncer de pulmón avanzado y puede tener menos efectos secundarios que otros tratamientos (Hu-Lieskovan S *et al.*, 2020).

- **Inhibidores de punto de control inmunitario (IPC):** Son anticuerpos como: durvalumab, nivolumab, pembrolizumab y atezolizumab que ayudan a activar el sistema inmunológico del cuerpo para que pueda identificar y atacar las células cancerosas, generalmente van contra PD-1 y PDL-1 (Hu-Lieskovan S *et al.*, 2020). En ensayos clínicos se ha encontrado una tasa de respuesta de 35% con una media en la supervivencia sin progresión de la enfermedad de 8.1 meses (Reck M *et al.*, 2022). La vigilancia federal ha detectado algunos efectos secundarios como: fatiga, prurito, erupciones cutáneas, diarrea, inflamación de órganos, reacciones autoinmunes, etc.
- **PARP:** Es una enzima que desempeña un papel importante en la reparación del ADN, los inhibidores para esta enzima fueron originalmente desarrollados para pacientes con mutaciones en BRCA1 o BRAC2. Los inhibidores de PARP como: olaparib y nilaparib bloquean la actividad de esta enzima, lo que lleva a la acumulación de daño en el ADN y a la muerte celular en las células tumorales (Li S *et al.*, 2022). La vigilancia federal ha detectado algunos efectos secundarios como: mielosupresión, fatiga, náuseas, pérdida de apetito dolor abdominal, diarrea, etc.

- **Vacunas contra el cáncer:** Estas vacunas aun en desarrollo están diseñadas para estimular el sistema inmunológico del cuerpo para que pueda reconocer y atacar las células cancerosas, se pueden utilizar diferentes antígenos tumorales desde péptidos, células, ácidos nucleicos, etc. Se dividen en cuatro clases vacunas basadas en células, vacunas basadas en ácidos nucleicos, vacunas basadas en virus y vacunas basadas en péptidos (Liu J et al., 2022).
- **Terapia de células NK:** Esta terapia aun en desarrollo se ha propuesto como una opción contra el cáncer ya que son altamente letales contra células carentes de MHC-I, sin embargo, se ha visto que hay células cancerosas que expresan MHC-I porque evaden este sistema; actualmente se están investigando células NK alogénicas para superar estos obstáculos (Lamers-Kok N et al., 2022).
- **Terapia de virus oncolíticos:** Esta terapia aun en desarrollo se basa en utilizar virus modificados que puedan infectar células cancerosas. Tiene dos formas de actuar, una es que por infección viral las células cancerosas liberen montones de citocinas y recluten a la maquinaria inmunológica; la segunda es que entren a la célula cancerosa y detengan su maquinaria de división para usarla a su favor y que el virus se replique dentro y termine matando a la célula (Li L et al., 2020).

2.9. KRAS

Existen 2 isoformas de la proteína K-Ras que son resultado del splicing alternativo que puede sufrir el gen KRAS. Las proteínas resultantes son K-Ras4A y K-Ras4B. Ambas difieren en su región hipervariable debido al splicing alternativo que se genera al final del exón 3 del gen KRAS, la isoforma K-RAS4B en particular pierde su sitio de palmitoilación y en su lugar incorpora una secuencia rica en poli lisinas que interactúan electroestáticamente con la región hidrofóbica de la membrana plasmática como se observa en la **figura 8** (Nuevo-Tapioles C & Philips MR, 2022).

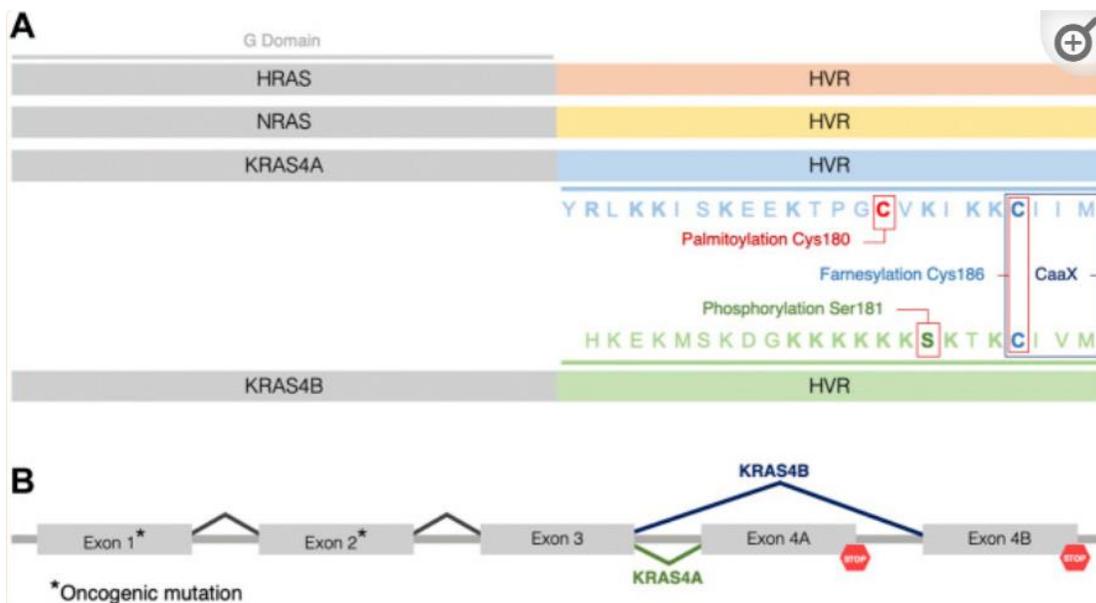


Figura 8 Estructuración de las proteínas de la familia de K-Ras.

(A) comparación entre las regiones variables y constantes de las proteínas asociadas a la familia KRAS comparando los aminoácidos de la isoforma K-Ras4a de K-Ras4B en la región hipervariable. (B) Splicing alternativo de K-Ras para formar la isoforma K-Ras4a y K-Ras4B (imagen modificada de Nuevo Tapioles C Philips MR, 2022).

La isoforma K-Ras4B es de suma importancia debido a que prevalece sobre la isoforma K-Ras4A en cáncer de pulmón y es la más estudiada para entender el efecto de K-RAS en cáncer. De igual manera en cáncer de pulmón las mutaciones de K-Ras4B abarcan hasta el 30 % de incidencia en cáncer de pulmón (von Karstedt S & Walczak H, 2020), aunque K-Ras se ha considerado como objetivo terapéutico contra cáncer que tiene mutaciones en este gen, también se le ha denotado como un objetivo imposible para el uso de drogas ya que carece de epítopos que se puedan utilizar.

K-Ras4B pasa por varias modificaciones post traduccionales, la primera modificación que sufre es la adición de un grupo farnesilo en la cisteína del motivo CAAX, posteriormente una endonucleasa llamada RCe1 corta el enlace peptídico entre la cisteína y el aminoácido siguiente del motivo CAAX. Por último, sufre una adición de un grupo metilo por la enzima Icmt “Isoprenilcisteína carboximetil transferasa” como se puede apreciar en la **figura 9**, estas modificaciones son

necesarias para que pueda salir del complejo de endomembranas y ser transportada por PDE6δ como se observa en la **figura 12** (Nussinov R *et al.*, 2021)

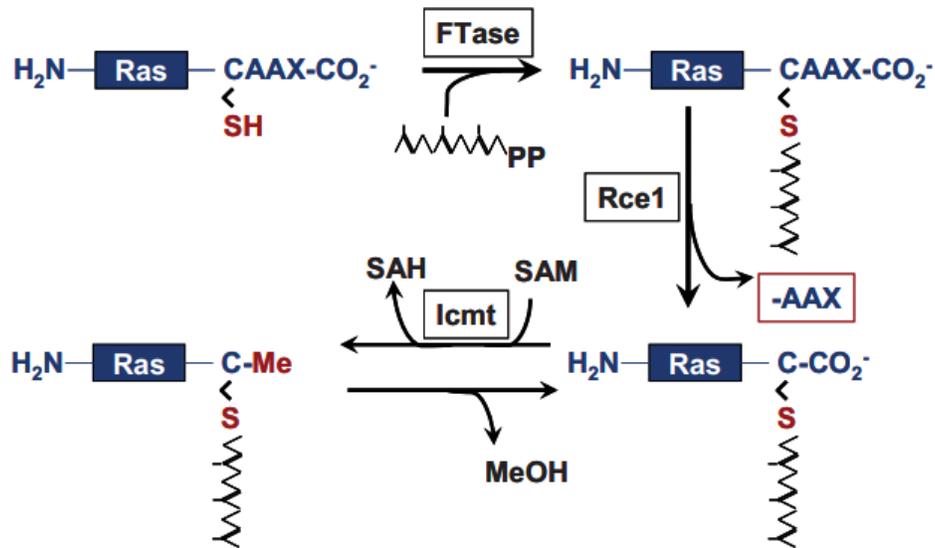


Figura 9 Modificaciones post traduccionales de las proteínas Ras.

En la imagen se puede observar la secuencia de las modificaciones post traduccionales que van sufriendo las proteínas de la familia Ras para su maduración y posterior transporte hacia la membrana plasmática (Imagen modificada de la tesis de Cristina López Alcalá, 2006).

Una característica importante de K-Ras4B es que posee un sitio de fosforilación en la posición 181, cuando se agrega un fosfato actúa como un switch lo que provoca debilidad en su unión a la membrana plasmática y aumenta su capacidad de translocar a otros compartimentos membranosos (Nuevo-Tapioles C & Philips MR, 2022), el grupo farnesilo junto al tramo de poli-lisinas en su extremo carboxilo condiciona a K-Ras4B para que no pueda ser transportada hacia la membrana plasmática por vesículas y tenga que ser extraída del complejo de endomembranas por medio de la chaperona citosólica llamada Fosfodiesterasa-6 (PDE6δ) para poder llegar a la membrana plasmática (Nussinov R *et al.*, 2021).

La isoforma K-Ras4B es susceptible a mutaciones en el codón 12, 13 y 61 lo que lleva a una constante activación de las vías de señalización MEK/ERK, PI3K/AKT, Ral y NF-κB como se observa en la **figura 10** resultando en el inicio de un proceso oncogénico (Nuevo-Tapioles C & Philips MR, 2022).

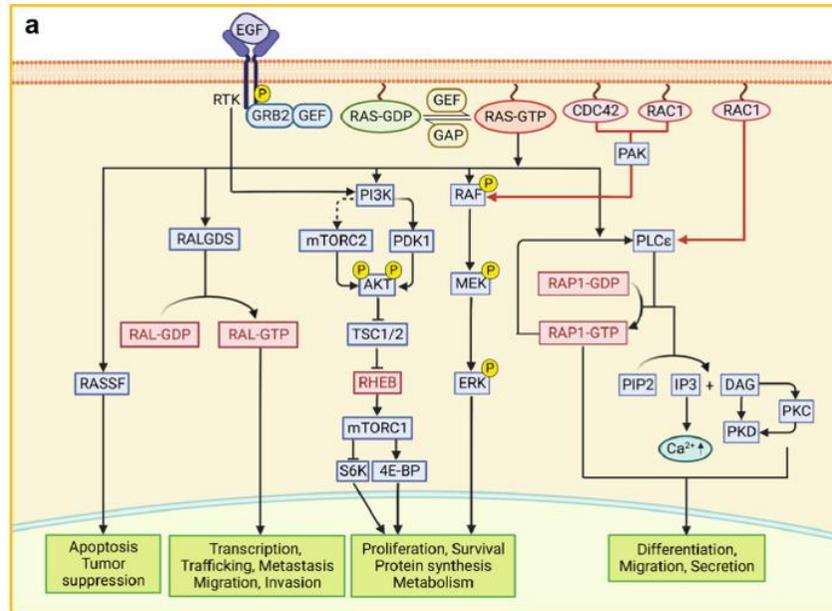


Figura 10 Vías que pueden activar las proteínas oncogénicas de la familia Ras.

Vías de señalización controladas por la activación de GTPasas de la familia Ras (imagen modificada de Yin G et al., 2023).

Se han desarrollado inhibidores para detener la vía de señalización mediada por K-Ras4B^{mut}, desde los receptores asociados a Ras como EGFR, hasta los efectores río abajo de K-Ras4B^{mut} como MEK, ERK, RAF, PI3K, AKT, etc., como se observa en la **figura 11**, sin embargo, el porcentaje de respuesta es menor al 50% debido a la adaptabilidad que tienen las células cancerosas pudiendo activar algunos de estos efectores mediante otras vías de señalización o adaptándose para resistirse a la inhibición. Recientemente se ha desarrollado un fármaco para el tratamiento de cáncer de pulmón con la mutante de K-Ras4B^{G12C}, este inhibidor se llama Sotorasib y es específico de esta mutante al unirse mediante un enlace covalente (Yin G et al., 2023).

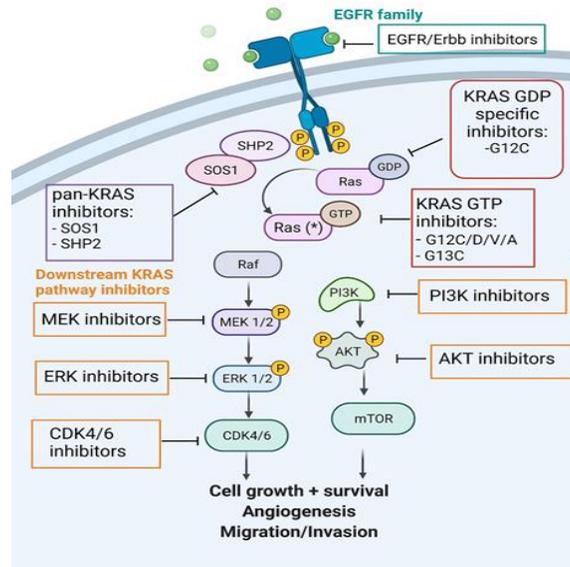


Figura 11 Inhibidores que se utilizan para detener la señalización de las vías que activan las proteínas de la familia Ras.

En la imagen se observan diferentes blancos de los inhibidores que se utilizan para detener la activación de las vías de señalización de las proteínas de la familia Ras (imagen modificada de Cucurull M et al., 2022).

2.9.1. Fosfodiesterasas (PDEs)

Las fosfodiesterasas son enzimas que catalizan el enlace fosfodiéster hidrolizando el enlace nucleótido 3',5'-cíclico regresando a estos segundos mensajeros a su correspondiente nucleótido 5' monofosfato. Dentro de la superfamilia de las fosfodiesterasas se dividen en 11 fosfodiesterasas cada una teniendo diferente sustrato o el mismo que otras y localizándose en distintos órganos del cuerpo.

2.9.2. Fosfodiesterasa 6 (PDE6)

La enzima fosfodiesterasa 6 se encuentra preferencialmente en la retina donde desempeña un papel muy importante, el cual consta en finalizar la señalización por el segundo mensajero GMPc debido a la degradación de este por medio de PDE6 activada por la luz. PDE6 es un tetrámero el cual consta de polipéptidos P α , P β y P γ en una relación molar de 1:1:2, los polipéptidos P α y P β contienen sitios catalíticos mientras que P γ contiene el sitio inhibidor de la actividad enzimática. Por acción de la luz el isómero 11-*cis*-retinal cambia su conformación a *trans*-retinal lo que lleva a la activación de la opsina y esto a su vez induce la

activación de la transducina al intercambiar GDP por GTP ocasionando la liberación de la subunidad α_1 del complejo $\beta\gamma$ que activa la PDE6 permitiendo PDE6 hidrolice GMPc (Receptores celulares y la transducción de señales pág. 146-158).

2.9.3. Complejo KRAS4B/PDE6 δ

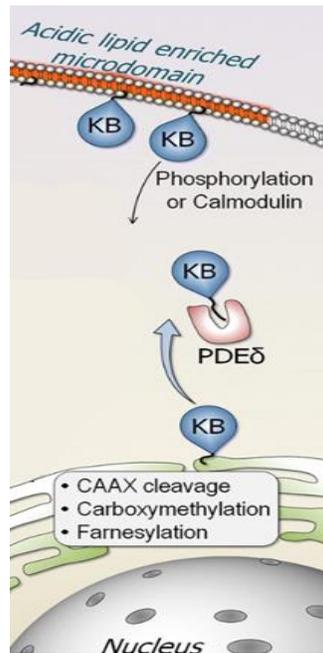


Figura 12 Transporte de K-Ras4B hacia la membrana plasmática.

En la imagen se puede observar cómo es necesario que K-Ras4B forme el complejo con PDE6 δ para que pueda ser transportado hacia la membrana plasmática, también se observa que cuando es fosforilada K-Ras4B está pierde su interacción con la membrana y permite la separación de la membrana (imagen modificada de Nussinov R et al., 2021).

Particularmente K-Ras4B tiene una alta afinidad por el complejo PDE6 δ siendo esta proteína su chaperona para que sea translocada a la membrana plasmática como se observa en la **figura 12**. Mediante simulaciones de dinámica molecular se ha propuesto que PDE6 δ tiene una alta afinidad por las proteínas de la familia Ras que no hayan recibido palmitoilación, pero si farnesilación y geranil geranilación. La proteína K-Ras4B es farnesilada en la Cisteína del extremo carboxilo lo que le permite interactuar con PDE6 δ formando el complejo PDE6 δ -K-Ras4B como se representa en la **figura 13** (Muratcioglu S et al., 2017).

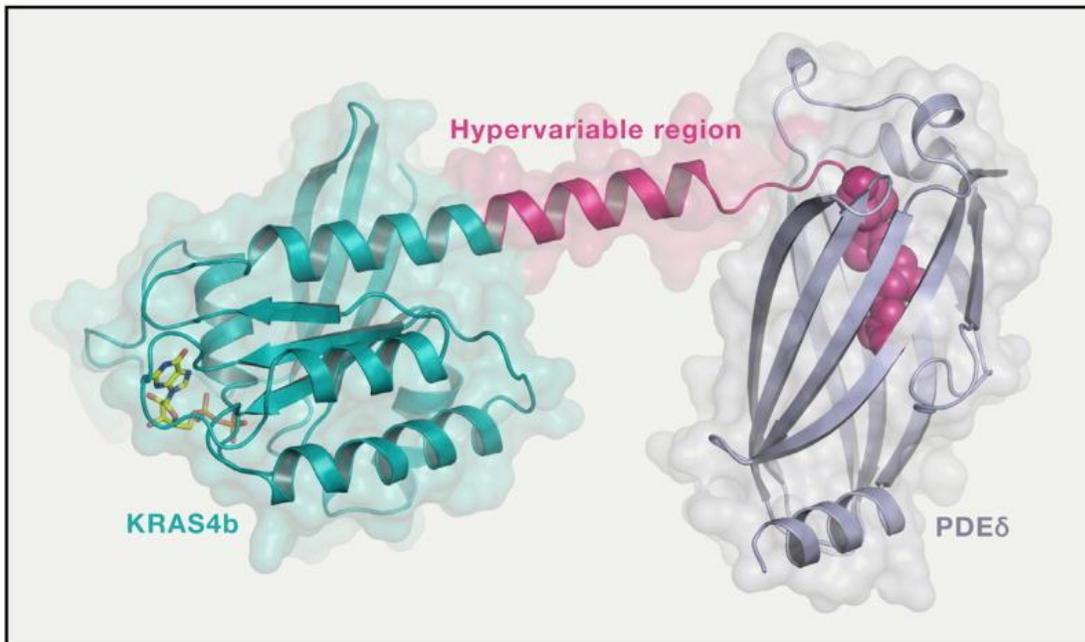


Figura 13 Complejo K-Ras4B~PDEδ.

Interacción entre la cisteína farnesilada de K-Ras4B con la proteína PDE6δ para la formación del complejo K-Ras4B~PDEδ. (imagen tomada de Simanshu DK et al., 2017).

3. Antecedentes

3.1. Efecto antineoplásico de los compuestos P8 y C14 en PDAC con K-Ras^{mut}.

Nuestro grupo de investigación se dio a la tarea de investigar **una cura potencial** para el adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC por sus siglas en inglés), este tipo de cáncer es altamente letal en donde aproximadamente el 90 % de los casos clínicos perecen (Briseño Diaz P *et al.*, 2023). Las mutaciones que predominan en PDAC son en K-Ras, TP53, SMAD4 y CDKN2A/p16, de las cuales K-Ras mutado prevalece en el 80 % aproximadamente de los casos (Hu HF *et al.*, 2021).

Los resultados de nuestro grupo de investigación concluyeron que en las líneas celulares Mia PaCa-2 con mutación en K-Ras^{G12C}, PANC-1 con mutación en K-Ras^{G12D} y Capan-1 con mutación en K-Ras4B^{G12V} de adenocarcinoma ductal

pancreático, los compuestos P8 y C14 tienen un efecto citotóxico sobre estas líneas tumorales. Obtuvieron un IC_{50} para el compuesto P8 de 24.18, 51.18 y 28.96 μM para Mia PaCa-2, PANC-1 y Capan-1 mientras que el IC_{50} del compuesto C14 fue de 90.18, 103.5 y $\sim 28.96 \mu M$ para Mia Paca 2, PANC-1 y Capan-1 respectivamente. Como dato relevante en la línea celular no cancerosa HTERT se requieren concentraciones más altas de cada compuesto para observar un efecto citotóxico siendo el IC_{50} del compuesto P8 de 103.45 μM mientras que el IC_{50} del compuesto C14 fue de 171.4 μM . De igual manera observaron que ambos compuestos P8 y C14 promueven la muerte por apoptosis en la línea celular Mia PaCa-2 con un 60 % de muerte aproximadamente, por otro lado, en la línea celular PANC-1 alcanzó el 50 % de muerte y en la línea Capan-1 hubo muerte de hasta un 30 %.

Estos efectos de muerte y citotoxicidad se dan a razón que los compuestos P8 y C14 estabilizan la interacción entre el complejo K-Ras4B~PDE6 δ y esto evita que PDE6 δ pueda liberar a K-Ras4B en la membrana plasmática por lo que se interrumpe la señalización oncogénica de K-Ras4B

La energía de Gibbs que presenta el compuesto P8 es de $\Delta G -101.77$, $\Delta G -103.35$, y $\Delta G -126.14$ kcal/mol en las líneas PANC-1, Mia PaCa-2 y Capan-1 respectivamente lo que significa una alta afinidad, mientras que la energía de Gibbs que presenta el compuesto C14 es de $\Delta G -98.98$, $\Delta G -100.3$, y $\Delta G -99.36$ kcal/mol en las líneas PANC-1, Mia PaCa-2 y Capan-1 respectivamente siendo más baja la afinidad que con el compuesto P8. Adicionalmente la energía de Gibbs en la línea HTERT que es de $\Delta G -86.6$ y $\Delta G -101.77$ para C14 y P8 respectivamente, lo cual significa que los compuestos requieren más energía para llevar a cabo la interacción y son menos afines a K-Ras^{WT}.

Por otra parte también observaron una gran disminución en los niveles de fosforilación de las proteínas AKT y ERK, los compuestos P8 y C14 disminuyeron la activación de AKT un 100 % y de ERK desde un 80-99% en la línea celular PANC-1, sin embargo en la línea celular Mia PaCa-2 ambos compuestos disminuyeron la activación de AKT desde un 90-100 % y solamente P8 redujo la activación de ERK un 100% lo que significa una reducción casi total de la activación de ERK y AKT.

Por otro lado, en la línea Capan-1 ambos compuestos redujeron la activación de AKT un 10% y de ERK desde 80-90% aproximadamente.

En otro punto los datos de mayor relevancia son los que se obtuvieron en los ensayos con xenotrasplantes, en donde se observó una reducción del volumen tumoral desde un 80% hasta un 95% utilizando 30 y 60 mg/Kg tanto del compuesto P8 como del compuesto C14, sin embargo, el mejor efecto antineoplásico se observó usando 30 mg/Kg de la combinación de P8 y C14 llegando a alcanzar una reducción del volumen tumoral de 99%. Inclusive también se realizaron xenotrasplantes con cultivos primarios de PDAC con K-Ras^{mut} observando una erradicación de los tumores usando los compuestos P8 y C14. Caso contrario al uso del fármaco gemcitabina que se utiliza como tratamiento de primera línea en cáncer de páncreas, este fármaco redujo el volumen tumoral desde un 50% hasta un 60% siendo la mitad de eficiente que los compuestos P8 y C14 sin embargo como dato alarmante a partir del 5 día de tratamiento los ratones comenzaban a morir.

En conclusión, estos datos afirman que los compuestos P8 y C14 tienen propiedades antineoplásicas sobre cultivos primarios de PDAC con K-Ras^{mut} y sobre las líneas cancerosas Mia PaCa-2 con mutación en K-Ras^{G12C}, PANC-1 con mutación en K-Ras^{G12D} y Capan-1 con mutación en K-Ras4B^{G12V}.

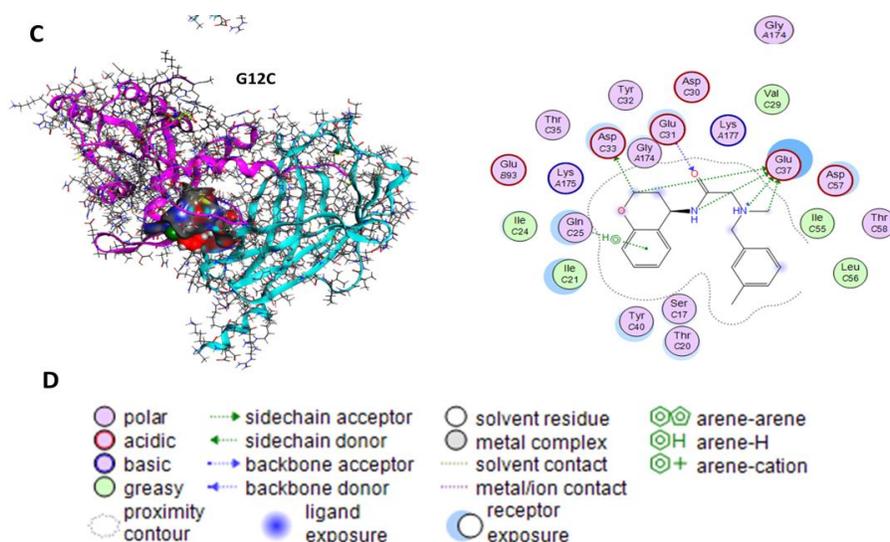


Figura 14 Interacción del compuesto C14 con el complejo K-Ras4B^{G12C}~PDE6δ.

C) Conformación tridimensional del compuesto C14 y su interacción tridimensional con el cristal del complejo K-Ras4B^{G12C}~PDE6δ. D) Interacciones químicas entre los elementos que componen al compuesto C14 y los

aminoácidos que conforman al complejo K-Ras4B^{G12C}~PDE6δ (imagen modificada de Briseño Diaz P et al., EMBO Molecular Medicine, submitted).

3.2. Efecto antineoplásico de los compuestos P8 y C14 en Cáncer de mama triple negativo con K-Ras^{mut}.

Después de haber observado el efecto antineoplásico en PDAC con mutaciones en K-Ras, nuestro laboratorio se dio a la tarea de investigar si estos mismos compuestos P8 y C14 también ejercían un efecto antineoplásico en cáncer de mama triple negativo que es el subtipo más agresivo. De igual forma se ha reportado que las mutaciones en K-Ras4B participan en la adquisición de resistencia a la quimioterapia por lo que se decidió evaluar el efecto antineoplásico en líneas celulares normales y radio resistentes de cáncer de mama triple negativo (Carrión Estrada DA *et al.*, 2024)

Los resultados de nuestro grupo de investigación concluyeron que los compuestos P8 y C14 son afines al complejo K-Ras4B^{G13D}-PDE6δ con valores de unión (ΔG) de -497.8 y -490.2 Kcal/mol respectivamente. mientras que para K-Ras4BWT la afinidad es mucho menor siendo de -406.9 Kcal/mol.

Se utilizó la línea celular MCF-10A que es no cancerígena, también se utilizaron las líneas celulares MDA-MB-231 y MDA-MB-231RR, la primera línea celular tiene mutación en K-Ras4B^{G13D} y la segunda es la misma línea, pero radio-resistente y por último se utilizó la línea celular cancerosa MCF-7 con K-RAS^{WT}. En las cuatro líneas celulares se probó la citotoxicidad de los compuestos a 24 y 48 horas obteniendo los valores de IC₅₀ que se presentan en la **tabla 6** confirmando que ambos compuestos afectan la viabilidad de las líneas celulares con mutación en K-Ras^{G12D}.

Compound	MCF-10A	MDA-MB-231	MDA-MB-231RR	MCF-7
IC50-24 (μ M)				
C14	591.4 \pm 210.0	91.1 \pm 3.9	128.2 \pm 2.6	174.2 \pm 19.0
P8	1,146.8 \pm 291.0	140.1 \pm 33.5	163.3 \pm 16.8	185.3 \pm 15.3
Cisplatin	12.0 \pm 0.0	352.1 \pm 41.2	200.0 \pm 0.0	150.3 \pm 32.1
IC50-48 (μ M)				
C14	310.2 \pm 10.6	60.0 \pm 6.6	70.6 \pm 3.5	134.5 \pm 10.5
P8	907.1 \pm 219.2	63.2 \pm 10.6	156.4 \pm 28.4	103.6 \pm 49.8
Cisplatin	5.9 \pm 1.6	296.8 \pm 34.8	103.6 \pm 8.7	67.3 \pm 20.6

Tabla 6 Valores de IC_{50} a 24 y 48 horas para las líneas celulares MCF-10A, MDA-MB-321, MDA-MB-231RR y MCF-7

Al evaluar la activación de los efectores ERK y AKT se encontró que en la línea MDA-MB-231 ambos compuestos P8 y C14 disminuyeron la activación de ERK hasta un 70%. Por otro lado, el compuesto P8 redujo la activación de AKT hasta en un 70% mientras que el compuesto C14 lo redujo hasta en un 60%. En consiguiente para la línea radio resistente MDA-MB-231RR ambos compuestos P8 y C14 redujeron la activación de ERK hasta en un 35 y 30% respectivamente, mientras que ambos compuestos mostraron una reducción menor al 70% en la activación de AKT indicando que los compuestos P8 y C14 afectan la señalización intracelular de la vía MAPK y AKT/mTOR desembocando en muerte celular que se midió posteriormente.

En el caso de la línea MDA-MB-231 el compuesto C14 indujo la muerte por apoptosis hasta un 18.52% mientras que la muerte por necrosis se mantuvo en un 0.56%, asimismo el compuesto P8 exhibió un mayor porcentaje de muerte por apoptosis siendo este de 48.5% mientras que la muerte por necrosis se mantuvo en 4.28%.

Además de observar la inducción del arresto celular al usar los compuestos P8 y C14 en las líneas celulares cancerosas, también se evaluó el efecto antineoplásico de estos mismos compuestos en modelos murinos con xenotrasplantes. El resultado que se obtuvo fue relevante ya que observaron una reducción en el volumen tumoral de 40% al utilizar 30 mg/Kg del compuesto C14 y por otro lado 30 mg/Kg del compuesto P8 redujo el volumen tumoral hasta un 41.6%. Por el contrario, el tratamiento con cisplatino mato a todos los ratones antes del sexto día.

En conclusión, estos datos afirman que los compuestos P8 y C14 tienen un efecto antineoplásico preferente en mutantes de K-Ras4B además de afectar vías de señalización controladas por la activación de ERK y AKT en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo con K-Ras4B^{G13D}.

3.3. PGK1

La proteína PGK1 desempeña un papel fundamental en el metabolismo de las células ya que participa en la primera reacción que genera ATP en la glicolisis catalizando a 1,3-bifosfoglicerato en 3-fosfoglicerato (Chen Liang et al., 2019).

Se ha encontrado que PGK1 es importante en tumores con mutación en SMAD4⁻; primero observaron que SMAD4 interactúa con TGF-β para reprimir el promotor de PGK1, cuando los tumores son SMAD4⁻ no existe esa represión lo que aumenta los niveles de PGK1 en la célula. PGK1 puede estar en altas cantidades ya sea en el citosol o en el núcleo dependiendo de donde está genera una reprogramación metabólica; cuando se encuentra en el citosol, las células cancerosas potencian su proliferación al producir altas cantidades de lactato por la vía de glicólisis y por ende altas cantidades de energía en menor tiempo. Mientras que en el núcleo PGK1 actúa como factor de transcripción reprimiendo al promotor de E-cadherina ocasionando una preferencia del metabolismo hacia la fosforilación oxidativa lo que comienza a generar el fenotipo mesenquimal en las células cancerosas con mutaciones en SMAD4⁻ (Chen Liang et al., 2019).

Otro grupo encontró que durante un estado de hipoxia en líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas con K-Ras^{WT} o hiperactivación de la vía MAPK por parte de K-Ras^{G12V} en líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas, la enzima pERK fosforila a la enzima PGK1 causando una translocación del citosol a la mitocondria en donde PGK1 fosforilada actúa como una cinasa y fosforila a Piruvato Deshidrogenasa Cinasa 1 (PDHK1) activándola y

esta a su vez fosforila a Piruvato Deshidrogenasa (PDH) lo que provoca su inactivación como se observa en la **figura 16** (Li X *et al.*, 2016).

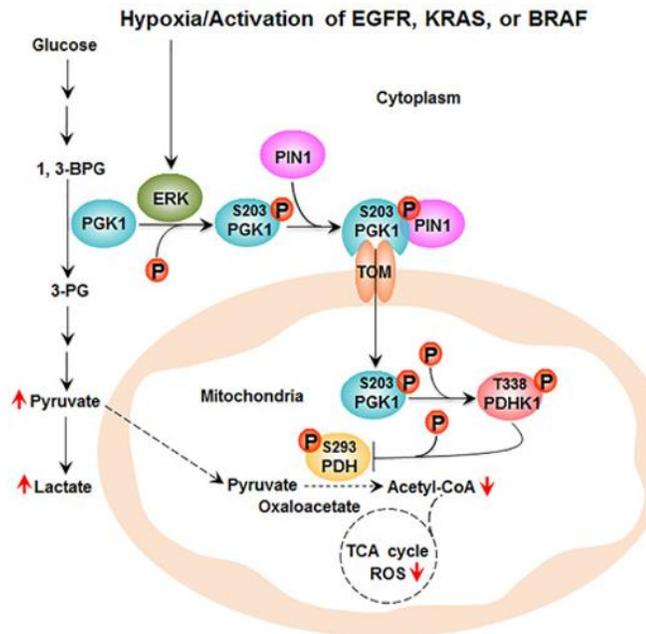


Figura 15 Efecto de la hiperactivación de ERK en la translocación de PGK1 hacia la mitocondria.

La hiperactivación de ERK permite que pERK fosforile a la enzima PGK1 en el residuo S203, esto permite la asociación de prolil isomerasa (PIN1) para que PGK1 pueda translocar a la mitocondria y dentro fosforilar a PDHK1 en el residuo T338, pPDHK1 se activa y fosforila a PDH en el residuo S293, PDH queda inactiva por lo que deja de convertir piruvato en Acetil-CoA (Imagen modificada de Li X *et al* 2016).

Este proceso retiene al piruvato de ser transformado en Acetil-CoA por lo que no entra al ciclo de Krebs resultando en una acumulación de piruvato en el citosol y su conversión a Lactato provocando un aumento en la vía de la glucólisis anaerobia potenciando el efecto Warburg y llevando a las células cancerosas a un aumento en los niveles energéticos favoreciendo el crecimiento, proliferación y metástasis hacia cerebro, También ocasiona que el exceso de lactato en la célula sea

expulsado al medio extracelular acidificándolo y afectando negativamente la función anti oncogénica del sistema inmune (Li X *et al.*, 2016).

4. Justificación

La caracterización *In vitro* y los ensayos en modelos murinos de los compuestos C14 y P8 en líneas celulares de cáncer de páncreas y mama con mutaciones en K-Ras4B han mostrado resultados prometedores al evaluar la actividad antineoplásica de estos compuestos. Con base en esta información, es posible que también ejerzan actividad antineoplásica en líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas con mutaciones en K-Ras4B.

5. Hipótesis

Los compuestos P8 y C14 ejercen un efecto antineoplásico en líneas de cáncer de pulmón de células no pequeñas con mutaciones en K-Ras4B.

6. Objetivo General

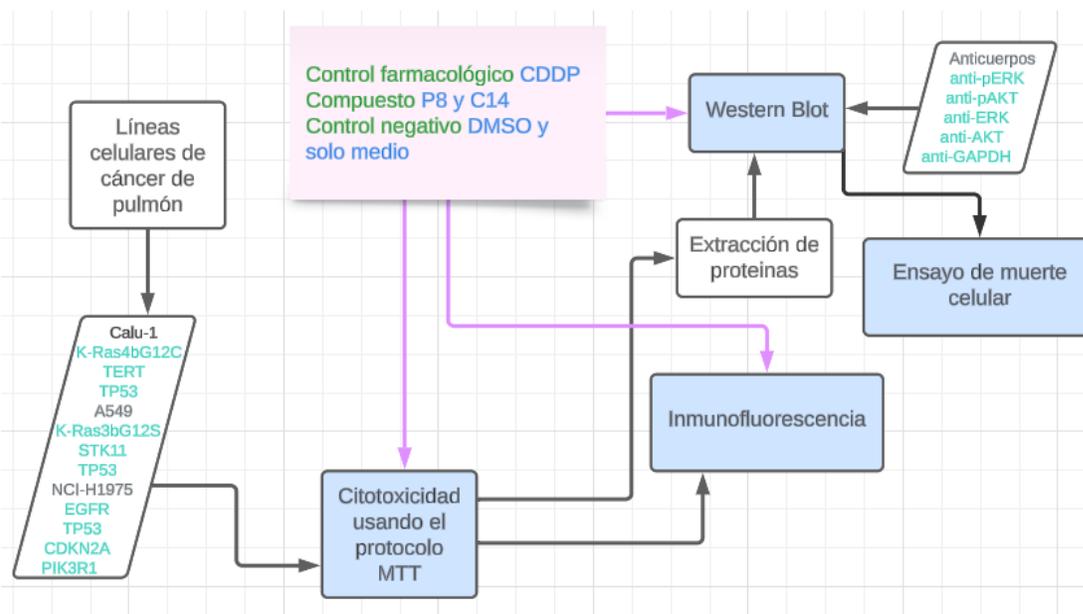
- Caracterizar las propiedades antineoplásicas *In vitro* de los compuestos P8 y C14 en diferentes líneas de cáncer de pulmón de células no pequeñas.

7. Objetivos Específicos

1. Determinar la actividad citotóxica de los compuestos P8 y C14 en líneas de NSCLC. Cáncer de pulmón de células no pequeñas
2. Evaluar el impacto de los compuestos sobre la activación de ERK y AKT en líneas de NSCLC. Cáncer de pulmón de células no pequeñas
3. Determinar si los compuestos promueven la muerte celular por apoptosis en líneas de NSCLC

- Observar el impacto de los compuestos P8 y C14 sobre la localización celular de PGK1 en líneas de NSCLC.

8. Desarrollo Experimental



9. Materiales y métodos

9.1. Compuestos

Los compuestos P8 y C14 fueron adquiridos de la compañía ENAMINE (Kyiv, Ukraine), se disolvieron 17.5 mg del compuesto P8 en 500 μ l de DMSO al 100%, el compuesto C14 que se utilizó fue uno que ya estaba preparado a una concentración de 106,730 μ M en 450 μ l de DMSO al 100%. El Cisplatino CDDP fue adquirido de Accocit y se utilizó la presentación de 10 mg/ml en solución inyectable. Todos los solventes y reactivos utilizados fueron adquiridos con el más alto grado de pureza disponible en el mercado.

9.2. Líneas Celulares

La línea celular H1975 EGFR^{L858R,T790M} fue adquirida de (ATCC) y se usó como control negativo de mutación en K-Ras4B, las líneas Calu1 K-RAS4B^{G12C} y A549 K-

Ras4B^{G12S} fueron donadas por la doctora Claudia Haydée González de la Rosa de UAM Cuajimalpa. Las líneas celulares fueron cultivadas en monocapa, adheridas al fondo de una placa p100 usando medios de cultivo específicos sugeridos por la American Type Culture Collection (ATCC), los cuales son DMEM-F12K suplementado al 10% de SFB para la línea celular A549 K-Ras4B^{G12S}, RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB para las líneas celulares H1975 EGFR^{L858R,T790M}. Por último, la línea celular Calu1 K-RAS4B^{G12C} se cultivó con el medio modificado McCoy's 5 adquirido de ATCC y fue suplementado con SFB al 10%, adicionalmente se suplementaron todas las líneas con 1% de A-07 100x que es un antibiótico y antimicótico proveniente de *In vitro* S.A.

9.3. Descongelamiento

Se descongelaron los viales de las líneas celulares Calu1 K-RAS4B^{G12C}, A549 K-Ras4B^{G12S} y H1975 EGFR^{L858R,T790M} en un baño maría a 37 °C evitando sumergir todo el vial y que el agua alcance la tapa de los viales, posteriormente se tomó el mililitro que trae el vial y se colocó en una placa p100 de fondo plano transparente con 5 ml de medio adecuado para cada línea, adicionalmente se les añadió 5% extra de SFB para lograr que las células no tardaran tanto tiempo en proliferar y se dejó en incubación a 37°C con CO₂ al 5% hasta alcanzar una confluencia del 90%. La manipulación de las células se llevó a cabo en una campana de flujo laminar estéril.

9.4. Subcultivo de células

Una vez alcanzado el 90% de confluencia de cada línea se procedió a realizar subcultivos. Por cada línea celular se realizó una extracción de las células primero se retiró todo el medio, luego se lavaron las células con 2 ml de PBS, a continuación, se retiró el PBS para proceder a añadir 3 ml de tripsina. Se utilizaron pipetas Pasteur al vacío poniendo la punta en una orilla de la placa hasta retirar todo el líquido para cada paso de extracción de líquido.

Se dejaron con la tripsina durante 5 minutos para posteriormente ser observadas al microscopio buscando que tengan una forma redondeada y estén despegadas de la placa, inmediatamente se añadieron 3 ml de medio completo adecuado para cada línea, se extrajo el medio con las células de las placas p100

con micropipetas de 1000 μ l para ser colocado todo en 1 Tubo Falcon de 15 ml por línea, se centrifugó a 1500 rpm durante 4 min y todo el sobrenadante se extrajo por aspiración usando pipetas Pasteur al vacío cuidando que el pellet no se tocara o aspirara.

Posteriormente se resuspendió en 1000 μ l de medio adecuado para cada línea los pellets resultantes para ser inoculados en cuatro placas p100 por línea. Al finalizar se incubaron a 37° C con 5% de CO₂. Todo el experimento se realizó en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar para evitar contaminación cruzada o externa.

9.5. Actividad citotóxica y determinación del IC₅₀

Para determinar si los compuestos P8 o C14 tienen un efecto citotóxico sobre la viabilidad celular en las líneas Calu1 K-RAS4B^{G12C}, A549 K-Ras4B^{G12S} y H1975 EGFR^{L858R,T790M} se sembró por separado cada línea con una densidad de 5x10³ células por pozo en placas de 96 pozos con un volumen de 100 μ l de medio adecuado para cada línea por triplicado. Las células se incubaron durante 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente, se prepararon 8 diluciones de P8 y C14 a diferentes concentraciones las cuales fueron: 30, 90, 150, 210, 270, 360, 450 y 600 μ M en 50 μ l de medio cada una, se agregó cada dilución por pozo llegando a un volumen final de 150 μ l y se incubaron durante 72 horas a 37°C y 5% de CO₂.

Como control farmacológico se utilizó cisplatino (CDDP) y se realizó una curva dosis respuesta para cada línea celular, para la línea A549 K-Ras4B^{G12S} se prepararon 8 diluciones a diferentes concentraciones: 30, 60, 90, 120, 150, 180, 270 y 360 μ M mientras que para las líneas Calu1 K-RAS4B^{G12C} y H1975 EGFR^{L858R,T790M} las concentraciones fueron: 30, 90, 150, 210, 270, 360, 450 y 600 μ M, después se agregó cada dilución por pozo llegando a un volumen final de 150 μ l por pozo. Como dato adicional cada concentración que está en 50 μ l de medio al ser diluida en un total de 150 μ l de medio la concentración final se divide 3 veces. Esta curva dosis respuesta de CDDP se realizó con el fin de obtener el IC₅₀ adecuado para las líneas celulares y poder usarlo como control farmacológico más adelante, mientras que el control negativo no recibió ningún tratamiento.

En todos los ensayos el blanco que se utilizó fue solamente medio sin células. El control negativo que se utilizó fue solamente 50 µl de medio con DMSO hasta llegar a una concentración final de 0.7% en los 150 µl de volumen final en un pozo con células y que no tuviera ningún tratamiento.

Después de la incubación de 72 horas a 37°C y 5% de CO₂, para poder cuantificar la cantidad de células viables se agregó a cada pozo 5 µL de MTT (Sigma Aldrich) a una concentración de 5 mg/ml y se incubó durante 4 horas a 37°C y 5% de CO₂. En el fondo de cada pozo se formaron cristales de formazan debido a que el MTT fue metabolizado por las células viables por lo que se continuó el protocolo eliminando todo el medio líquido de cada pozo con cuidado y para solubilizar los cristales de formazan se añadió 50 µl de DMSO y se incubó durante 10 minutos a 37°C en condiciones de agitación lenta y oscuridad. Finalmente, se leyeron las muestras a 580 nm en el espectrofotómetro (Infinite F-500, serie 710006471, TECAN) y los resultados se analizaron usando el software GraphPad Prism 8 (GraphPad software, Inc. San Diego, CA), los datos obtenidos se utilizaron para determinar la concentración máxima inhibitoria media (IC₅₀) de cada compuesto para cada línea celular de NSCLC.

9.6. Ensayo de Western Blot

9.6.1. *Extracción de proteína total.*

Esta técnica se realizó para tener un extracto proteico de cada línea celular, para realizar esta técnica se cultivó en monocapa cada línea celular en placas p100, 5 placas por línea y se incubaron a 37°C con CO₂ al 5% hasta alcanzar un 95% de confluencia, posteriormente se quitó el medio se lavaron con PBS, se retiró el PBS y se les agregó 5 ml de medio sin Suero Fetal Bovino, el medio que se les agregó es el adecuado para cada línea y esta condición se mantuvo durante 16 horas. Pasadas las 16 horas las 5 placas por línea se sometieron a diferentes condiciones las cuales fueron; medio sin suero como control negativo, DMSO el control del vehículo, P8, C14 y CDDP, el control farmacológico. Las concentraciones que se utilizaron fueron los IC₅₀ que se obtuvieron del ensayo de viabilidad celular posteriormente se dejaron incubando a 37°C y 5% de CO₂ durante 3 horas, al término del tiempo a cada placa se le añadió 500 µl de Factor de Crecimiento Epidermal (100 ng /ml) y se dejó incubando a 37°C y 5% de CO₂ durante 10 minutos.

Después se sacaron las placas de la incubadora para ponerlas en hielo, se les retiró el medio y se lavaron con PBS, Posteriormente se retiró todo el PBS para añadirles 400 μ l de buffer de lisis (ab152163, Abcam), 5 μ l de Inhibidores de fosfatasa (4906837001, Roche) y 5 μ l de inhibidores de proteasas (11872580001, Roche). Las células lisadas se recolectaron con una micropipeta de 100 μ l y se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 ml, a continuación, se colocaron los tubos en un agitador rotatorio durante 40 min a 4°C. Al finalizar el tiempo se tomaron los tubos para colocarlos en una centrifuga a 14,000 rpm durante 10 minutos y continuando con la temperatura de 4°C. Después de centrifugarlo se recuperó en sobrenadante y se colocó en un tubo eppendorf nuevo de 1.5 ml. Se les agregó buffer laemmli 4X usando la siguiente formula $VI=(Vo/4)$ en donde VI es el volumen de laemmli 4X y Vo es el volumen total de mi sobrenadante. A continuación, se calentó la muestra en baño maría durante 5 minutos y para concluir, el volumen en cada tubo eppendorf de 1.5 ml se dividió en 3 tubos eppendorf de 200 μ l debidamente rotulados para ser almacenados a -20 °C.

9.6.2. Determinación de la activación de ERK y AKT.

Esta experimento se realizó para determinar si los compuestos P8 y C14 afectan la activación de los efectores ERK y AKT ya que es importante evitar la activación de ambas vías que llevan al desarrollo tumoral y para realizar este experimento las líneas celulares Calu1 K-RAS4B^{G12C}, A549 K-Ras4B^{G12S} y H1975 EGFR^{L858R,T790M} se cultivaron en placas p100, a 37°C con 5% de CO₂ hasta alcanzar un 95% de confluencia y se procedió con la técnica de extracción total de proteína previamente mencionada. Posteriormente se determinó la activación de dos de los principales efectores de K-Ras oncogénico, ERK y AKT fosforilado. Se corrieron 15 μ l de cada extracto proteico en geles SDS-PAGE de poliacrilamida al 10%, la separación de las proteínas mediante electroforesis se llevó a cabo con un voltaje de 100 V durante 2 horas. Una vez realizada la electroforesis, las proteínas en el gel fueron transferidas a membranas de PVDF, para conseguir esto las membranas fueron tratadas durante 2 minutos con metanol, después 2 minutos con ddH₂O y al final fueron equilibradas con el buffer de transferencia durante 15 minutos a temperatura ambiente. El gel se colocó en buffer de transferencia durante 15 minutos a temperatura ambiente, después se armó el sándwich teniendo en cuenta

la orientación del gel del lado negativo y la membrana del lado positivo, se conectó a la fuente y durante dos horas se corrió a un amperaje de 400 mA. Una vez que las proteínas se transfirieron a la membrana de PVDF, esta se incubó con la solución bloqueadora (Svel 5% y PBS-Tween al 0.2%) durante una hora y en agitación constante a 37°C, el exceso de la solución bloqueadora se eliminó y las membranas se lavaron con PBS-Tween durante 5 minutos, posteriormente se incubó cada membrana con el anticuerpo primario anti GAPDH (GTX100118, GeneTex) a una dilución de 1:100,000 en solución bloqueadora durante una noche a 4°C y en agitación. Después de 18 horas la membrana se lavó 3 veces con buffer de lavado (PBS-Tween al 0.2%), después se incubó durante una hora en agitación constante a 37°C con el anticuerpo secundario anti-conejo (65-6120, Invitrogene) a una dilución de 1:5,000, después cada membrana se lavó tres veces con buffer de lavado (PBS-Tween al 0.2%) y se colocaron en PBS para ser reveladas por quimioluminiscencia en el fotodocumentador (ChemiDoc MP, serie 731BR00166, BIO RAD). Después cada membrana recibió un lavado con el buffer de lavado (PBS-Tween al 0.2%) y se repitió el mismo protocolo partiendo desde la incubación con el anticuerpo primario, sin embargo, cada anticuerpo cambiaría después de cada revelado en el siguiente orden: anti-pERK, anti-pAKT, anti-ERK y anti-AKT. Los anticuerpos que se utilizaron fueron **anti-ERK fosforilado** (#9101, Cell Signaling Technology) con una dilución 1:1,000 en PBS-BSA al 1%, **anti-AKT fosforilado** (#4060, Cell Signaling Technology) con una dilución 1:1,000 en PBS-BSA al 1%, **anti-ERK total** (#9102, Cell Signaling Technology) con una dilución 1:1,000 en PBS-Tween-Sveel al 5% y **anti-AKT total** (#9272, Cell Signaling Technology) con una dilución 1:1,000 en PBS-Tween-Sveel al 5% en ese orden y los resultados se analizaron usando el software GraphPad Prism 8.

9.7. Ensayo de muerte celular por apoptosis

Esta técnica se realizó para determinar si los compuestos P8 y C14 provocan la muerte de las células cancerígenas por apoptosis o por necrosis y para realizar este experimento las líneas celulares Calu1 K-RAS4B^{G12C}, A549 K-Ras4B^{G12S} y H1975 EGFR^{L858R,T790M} se cultivaron en placas de 6 pozos y una placa p60, se adicionaron 2 ml en cada pozo de medio adecuado para cada línea y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ hasta alcanzar un 90% de confluencia. Después se dejaron

con diferentes condiciones las cuales fueron las siguientes: 2 pozos quedaron sin tratamiento, 1 pozo con DMSO al 0.18 %, 1 pozo con el IC₅₀ de P8, 1 pozo con el IC₅₀ de C14, 1 pozo con el IC₅₀ de CDDP y a la placa p60 se le retiró todo el medio, se lavó con 1 ml de PBS y finalmente se dejó con PBS. Estas condiciones se mantuvieron durante 72 horas y al término del tiempo se recolectaron las células por el método de tripsinización y después de centrifugar las células se retiró el sobrenadante de cada tubo Falcon de 15 ml, se re suspendieron en 20 µl de Buffer de citometría (PBS con 10% de SFB y 0.2 nM de EDTA) y esos 20 µl de Buffer con las células se pasaron a tubos eppendorf de 1.5 ml, posteriormente se les añadió 5 µl de un Stock 40X del reactivo Cell Event caspase 3/7 green (C10423, Thermo Fisher Scientific) obteniendo una concentración final de 5 µM. Se incubaron a 37°C con 5 % de CO₂ durante 1 hora. Al finalizar el tiempo, se les agregó 400 µl de buffer de citometría y 5 minutos antes de leer las muestras se les añadió 0.5 µl de Yoduro de propidio. La muerte celular se leyó por citometría de flujo en el citómetro FORTESSA perteneciente a la unidad National Experimental Services Laboratories (LaNSE) del Cinvestav Zacatenco, la muerte por activación de proteínas apoptóticas se determinó a una longitud de onda (Ex/Em = 488/530 nm) y la muerte celular por necrosis se determinó a una longitud de onda (Ex/Em = 590/610 nm), las células vivas fueron consideradas como aquellas que resultaron negativas para ambas longitudes de onda.

9.8. Inmunofluorescencia

Se utilizó esta técnica para visualizar si los compuestos P8 y C14 afectaban la localización celular de PGK1 en las líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas debido a que se ha visto implicada en la reprogramación metabólica cuando PGK1 se encuentra en mitocondria y en la transición hacia metástasis cuando PGK1 se encuentra en el núcleo. Se cultivaron por separado las líneas Calu1 K-Ras4B^{G12C}, A549 K-Ras4B^{G12S} y H1975 EGFR^{L858R,T790M} en placas de 6 pozos con un portaobjetos estéril y se inocularon 3x10⁴ células por pozo. Se dejaron incubando durante 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. Después se lavaron con 1 ml de PBS 3 veces y se les añadió 1 ml de medio sin suero con 100 nM de MitoTracker™ Red CMXRos (M7512, Thermo Fischer) durante 45 minutos, posteriormente se fijaron con 400 µl de paraformaldehído al 4% durante 30 minutos

a 37°C, se procedió a remover el paraformaldehído y realizar 3 lavados con 1 ml de PBS. Para permeabilizar a las células se les agregó 1 ml de Triton X-100 al 0.1% y se dejaron incubando durante 1 minuto a temperatura ambiente, posteriormente se removió el Triton X-100 y se lavaron 3 veces con 400 µl de PBS. Se continuó con el bloqueo de las células el cual se realizó con 1 ml de BSA al 3% y dejó en incubación a 37°C por 1 hora. Se procedió con la inmunotinción en la cual se diluyeron 6.4 µl de anticuerpo primario Anti-PGK1 (ab199438, Abcam) en 1600 µl de BSA al 1% para tener una dilución 1:250 y se incubaron en una cámara húmeda a 4°C toda la noche, después se removió el anticuerpo primario y se lavó 3 veces con 1 ml de PBS, para finalizar se agregó el anticuerpo secundario Alexa488-conejo con una dilución 1:250 (A11034, Invitrogen) y se dejó en incubación a 37°C cubierto de la luz durante 1 hora, después se lavaron 3 veces con 1 ml de PBS. Para montarlos al microscopio se retiró el cubreobjetos del pozo y se colocó inclinado a 70° para que escurriera todo el PBS y se secase, posteriormente se colocaron 8 µl de VECTASHIELD (H-1200, Vector) sobre el portaobjetos para posteriormente colocar el cubreobjetos sobre la gota, se eliminó el exceso de VECTASHIELD y se selló el cubreobjetos con barniz transparente. Las laminillas se observaron al microscopio confocal Leica TCS-SPE DMI4000 1st Gen perteneciente a la unidad National Experimental Services Laboratories (LaNSE) del Cinvestav Zacatenco y los resultados se analizaron usando el software Image J v.1.54J (Fiji project, Wisconsin-Madison).

10. Resultados

10.1. Determinación del efecto citotóxico de los compuestos P8 y C14 sobre la viabilidad en las líneas celulares de NSCLC; A549 (K-Ras4B^{G12S}), Calu1 (K-Ras4B^{G12C}) y H1975 (EGFR^{L858R,T790M}).

Para evaluar si los compuestos P8 y C14 afectan la viabilidad de las líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), se realizó un ensayo de viabilidad utilizando las líneas celulares: Calu 1 con mutación en Kras4B^{G12C}, A549 con mutación en Kras4B^{G12S} y H1975 con mutación en EGFR^{L858R,T790M}. En este ensayo, cada una de las tres líneas celulares fue tratada con los compuestos P8 y C14 utilizando una dosis única de 200 μ M durante 72 horas. La viabilidad celular se midió utilizando MTT, siguiendo los procedimientos descritos en la sección de Materiales y Métodos. Cabe aclarar que no se utilizó una línea sana ya que no se contaba con una línea celular adecuada para este rol.

Los resultados mostraron que el compuesto P8 reduce la viabilidad celular de la línea Calu1 (K-Ras4B^{G12C}) hasta en un 95%, mientras que el compuesto C14 reduce la viabilidad celular hasta en un 60% (**Figura 16a**). Para la línea celular A549 (K-Ras4B^{G12S}) el compuesto P8 reduce la viabilidad celular hasta en un 95%; en cambio, el compuesto C14 la disminuye en un 80% (**Figura 16b**). Por otro lado, en la línea H1975 (EGFR^{L858R,T790M}) el compuesto P8 disminuye la viabilidad celular en un 95%, mientras que el compuesto C14 la reduce en un 85% (**Figura 16c**).

Tras observar un efecto citotóxico de ambos compuestos a una concentración de 200 μ M, se consideró indispensable determinar el IC₅₀ para cada línea celular tratada con los compuestos P8, C14 y utilizando cisplatino como control. Para ello, se realizaron curvas dosis-respuesta, proporcionando un análisis cuantitativo más preciso del efecto citotóxico de estos compuestos en las líneas celulares NSCLC mencionadas: Calu1 (K-Ras4B^{G12C}), A549 (K-Ras4B^{G12S}) y H1975 (EGFR^{L858R,T790M}).

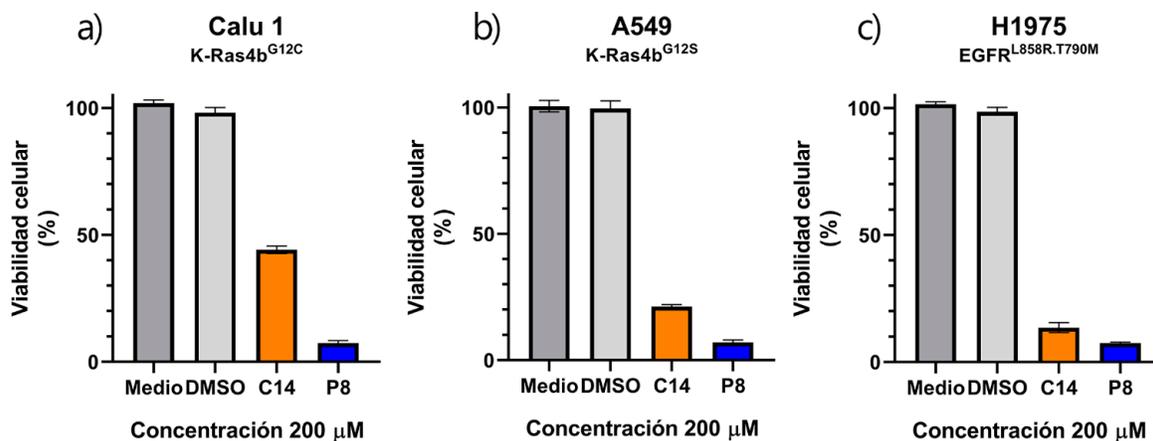


Figura 16 Evaluación del efecto citotóxico de los compuestos P8 y C14 sobre las líneas celulares de NSCLC; Calu1 K-Ras^{G12C}, A549 K-Ras^{G12S} y H1975 EGFR^{L858R,T790M}.

Efecto citotóxico de los compuestos P8 y C14 sobre la viabilidad celular en las líneas de NSCLC; Calu1 K-Ras^{G12C}, A549 K-Ras^{G12S} y H1975 EGFR^{L858R,T790M}. Se confrontaron con los compuestos P8 y C14 a una concentración de 200 μM y DMSO a una concentración de 0.7% durante 72 horas. Las barras en la gráfica representan la media, media \pm SEM de tres experimentos por separado.

Los resultados mostraron que para la línea A549 (K-Ras4B^{G12S}) el IC₅₀ del compuesto P8 fue de 80.83 \pm 6.45 μM , mientras que el compuesto C14 tuvo un IC₅₀ de 153.7 \pm 21.2 μM . Además, el tratamiento con cisplatino en esta misma línea arrojó un IC₅₀ de 21.99 \pm 16.94 μM , este valor es 4 veces menor que la concentración requerida por el compuesto P8. Los datos reportados sobre el IC₅₀ de cisplatino en esta línea van desde 2 μM hasta 30 μM (Zhao Y *et al.*, 2023; Niu X *et al.*, 2023; Cetintas VB *et al.*, 2012), por lo que el IC₅₀ obtenido para esta línea queda dentro de los parámetros. Adicionalmente el comportamiento sobre la viabilidad celular de la línea A549 K-Ras4B^{G12S} es dosis dependiente del compuesto P8, mientras que el compuesto C14 afecta muy poco la viabilidad celular a concentraciones menores de 50 μM , sugiriendo cierta resistencia al compuesto C14. Por otro lado, el tratamiento con cisplatino genera una caída abrupta sobre la viabilidad celular desde concentraciones menores a 10 μM (**figura 17a**).

Sin embargo, en la línea Calu1 (K-Ras4B^{G12C}) se reveló que el compuesto P8 posee un IC₅₀ de 95.78 \pm 6.11 μM a diferencia del compuesto C14 que posee un IC₅₀ de 193.8 \pm 10.3 μM . Por otra parte, con cisplatino los datos arrojan un IC₅₀ de

118.8±40.1 µM, dato 10 veces superior a lo que se ha reportado en la literatura a menos que esta línea sea quimio-resistente con lo cual sería similar este valor con lo reportado en la literatura (Tezcanli Kaymaz B *et al.*, 2014), Es importante destacar que el compuesto P8 no provoca una disminución en la viabilidad celular de esta misma línea celular a concentraciones menores de 70 µM y a partir de esa concentración la caída es abrupta. Además, con el compuesto C14 no se observa un cambio en la viabilidad celular hasta que la concentración alcanza 150 µM. Estos datos con los tratamientos de P8, C14 y cisplatino sugieren que la línea celular Calu1 (K-Ras4b^{G12C}) presenta resistencia para los tres tratamientos (**figura 17b**).

Para la línea H1975 (EGFR^{L858R,T790M}) se encontró que el compuesto P8 tiene un IC₅₀ de 167.02±229.24 µM, mientras que el compuesto C14 tiene un IC₅₀ de 149.48±391,37 µM. Por otra parte, el tratamiento con cisplatino revela un IC₅₀ de 41.56±6.74 µM, este valor es 4 veces menos que el que requieren los compuestos P8 y C14. En la literatura se han reportado valores similares de cisplatino en esta línea celular (Gorsick LK *et al.*, 2013). El comportamiento de la curva en este ensayo de viabilidad celular es similar entre los compuestos P8 y C14 (**figura 17c**).

Los datos de IC₅₀ para cada línea celular con la que se trabajó se encuentran resumidos en la **Tabla 7**.

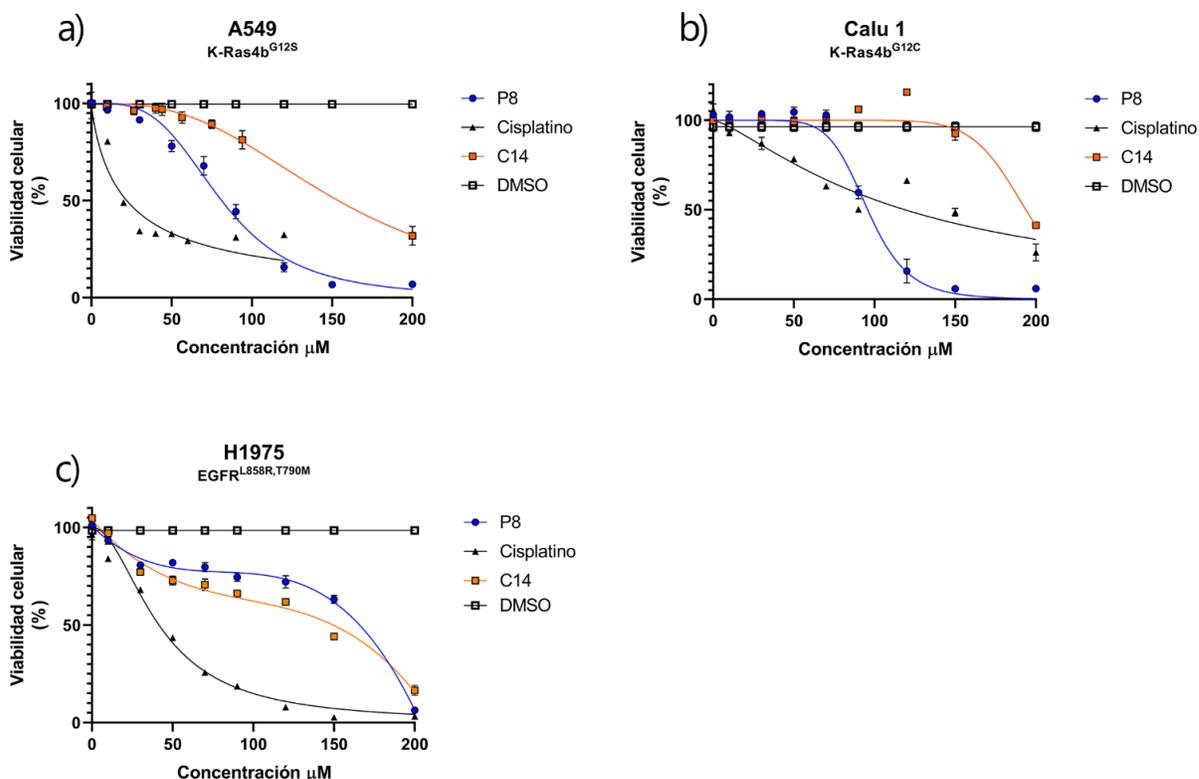


Figura 17 Los compuestos P8 y C14 disminuyen la viabilidad celular de NSCLC con K-Ras^{G12C} y K-Ras^{G12S}.

a) Curva dosis respuesta de la línea A549 con mutación en K-Ras^{G12S} tratada con concentraciones crecientes de los compuestos P8 y C14. **b)** Curva dosis respuesta de la línea Calu 1 con mutación en K-Ras^{G12C} tratada con concentraciones crecientes de los compuestos P8 y C14. **c)** Curva dosis respuesta de la línea H1975 con mutación en EGFR^{L858R,T790M} tratada con concentraciones crecientes de los compuestos P8 y C14. Efecto de los compuestos P8 y C14 sobre la viabilidad celular a diferentes concentraciones partiendo desde 0 μM hasta 200 μM durante 72 horas de exposición y se muestra el porcentaje de actividad normalizado para cada punto. Cisplatino (0-200 μM) se utilizó como control. DMSO a una concentración de 0.7% se utilizó como control del vehículo. Las líneas en la gráfica representan la media, media \pm SEM de tres experimentos por separado a excepción de cisplatino. Para el cisplatino solo se usan desde 2 a 30

Línea celular	IC ₅₀		
	P8	C14	Cisplatino
A549 ^{K-Ras4B G12S}	80.83 \pm 6.45	153.7 \pm 21.2	21.99 \pm 16.94
Calu 1 ^{K-Ras4B G12C}	95.78 \pm 6.11	193.8 \pm 10.3	118.8 \pm 40.1
H1975 ^{EGFR L858R,T790M}	167.02 \pm 229.24	149.48 \pm 391.37	41.56 \pm 6.74

Tabla 7 IC₅₀ de P8, C14 y CDDP.

IC₅₀ obtenido de cada compuesto a 72 horas de exposición en las tres líneas de cáncer de pulmón.

A manera de conclusión, el compuesto P8 presenta un mejor efecto citotóxico que el compuesto C14, esto se debe a que requiere menos concentración para alcanzar su IC₅₀ en las líneas celulares de NSCLC con mutaciones en K-Ras4B; A549 (K-Ras4B^{G12S}) y Calu1 (K-Ras4B^{G12C}). Por otro lado en la línea celular de NSCLC que no tiene mutación en K-Ras4B; H1975 (EGFR^{L858R,T790M}) ambos compuestos presentan un efecto citotóxico similar. En comparación con cisplatino las líneas celulares de NSCLC; A549 (K-Ras4B^{G12S}) y H1975 (EGFR^{L858R,T790M}) requieren dosis bajas de este fármaco (21.99±16.94 y 41.56±6.74) respectivamente para reducir la viabilidad celular en un 50%, lo cual sugiere que tienen un mejor efecto citotóxico que P8 en estas líneas. Por otra parte, la concentración de cisplatino que requiere la línea celular Calu1 (K-Ras4B^{G12C}) es un 20% superior respecto a la concentración que requiere el compuesto P8 sugiriendo que este compuesto tiene un mejor efecto citotóxico en esta línea.

10.2. Evaluación del impacto de los compuestos P8 y C14 en las vías de señalización ERK/AKT en las líneas celulares A549 (K-Ras4B^{G12S}), Calu1 (K-Ras4B^{G12C}) y H1975 (EGFR^{L858R,T790M}).

Una vez que se observó el efecto citotóxico de los compuestos P8 y C14 en las líneas celulares de NSCLC; Calu1 (K-Ras4B^{G12C}), A549 (K-Ras4B^{G12S}) y H1975 (EGFR^{L858R,T790M}). Nos preguntamos si este efecto citotóxico sobre la viabilidad se debía a una afectación de ambos compuestos sobre la activación de los efectores ERK y AKT río abajo de la activación de K-Ras4B, ya que se ha reportado que estas vías de señalización permanecen constitutivamente activas en las mutantes de K-Ras4B (Vigil D *et al.*, 2010). Para determinar el efecto de los compuestos P8 y C14 sobre los niveles de fosforilación de ERK y AKT, se procedió a realizar ensayos de Western Blot por lo que se obtuvieron extractos proteicos siguiendo el protocolo de extracción de proteínas que se detalla en materiales y métodos para las líneas celulares: Calu1 (K-Ras4B^{G12C}), A549 (K-Ras4B^{G12S}) y H1975 (EGFR^{L858R,T790M}) (**figura 18**).

Los resultados de los ensayos de densitometría mostraron que en la línea A549 (K-Ras4B^{G12S}) el compuesto P8 reduce los niveles de expresión de pERK en un 40%, mientras que reduce los niveles de expresión de pAKT desde un 30% hasta

un 45%. Por otra parte, el compuesto C14 reduce los niveles de expresión de pERK desde un 30% hasta un 40% y los niveles de expresión de pAKT en un 20%. Adicionalmente el fármaco cisplatino no genera afectación sobre los niveles de expresión de pAKT ni de pERK dado que su mecanismo de acción no se basa en la afectación de estas vías (**figura 18b, figura 18c**). Como dato relevante, la activación de AKT está relacionado con la adquisición de resistencia a diferentes fármacos y el fármaco Sotorasib no reduce los niveles de expresión de AKT en esta línea celular (Barrios Bernal P *et al.*, 2023) como si lo hacen los compuestos P8 y C14.

Con respecto a la línea H1975 (EGFR^{L858R,T790M}) los ensayos de densitometría revelaron que el compuesto P8 reduce los niveles de expresión de pERK en un 40%, asimismo también reduce los niveles de expresión de pAKT en un 30%, además el compuesto C14 reduce los niveles de expresión de pERK desde un 40% hasta un 45% junto con los niveles de expresión de pAKT desde un 25% hasta un 40%. Sin embargo, el fármaco cisplatino no genera una afectación significativa sobre los niveles de expresión en pAKT ni en pERK (**figura 18e, figura 18f**).

Por otro lado, en la línea Calu1 (K-Ras4B^{G12C}) los ensayos de densitometría revelaron que el compuesto P8 reduce los niveles de expresión de pERK en un 30%, siendo el caso contrario con los niveles de expresión de pAKT en donde no se observa un efecto significativo. En cuanto al compuesto C14 los resultados muestran que no tiene un efecto significativo sobre los niveles de expresión de pERK ni de pAKT y con respecto a cisplatino los resultados evidencian una nula afectación en los niveles de expresión de pAKT y de pERK (**figura 18h, figura 18i**).

Estos resultados demuestran que ambos compuestos P8 y C14 reducen la activación de los efectores río abajo de K-Ras4B, los cuales son AKT y ERK en las líneas celulares A549 (K-Ras4B^{G12S}) y H1975 (EGFR^{L858R,T790M}), mientras que cisplatino no afecta los niveles de activación de ERK y AKT a razón de que su mecanismo de acción es formar abductos con el ADN y no afectar directamente la activación de ERK y AKT. Por otro lado, en la línea celular Calu1 (K-Ras4B^{G12C}) solamente P8 redujo la activación de ERK sugiriendo que AKT podría no estar bajo control de K-Ras4B^{G12C} como se ha reportado en la literatura (Ihle NT *et al* 2012).

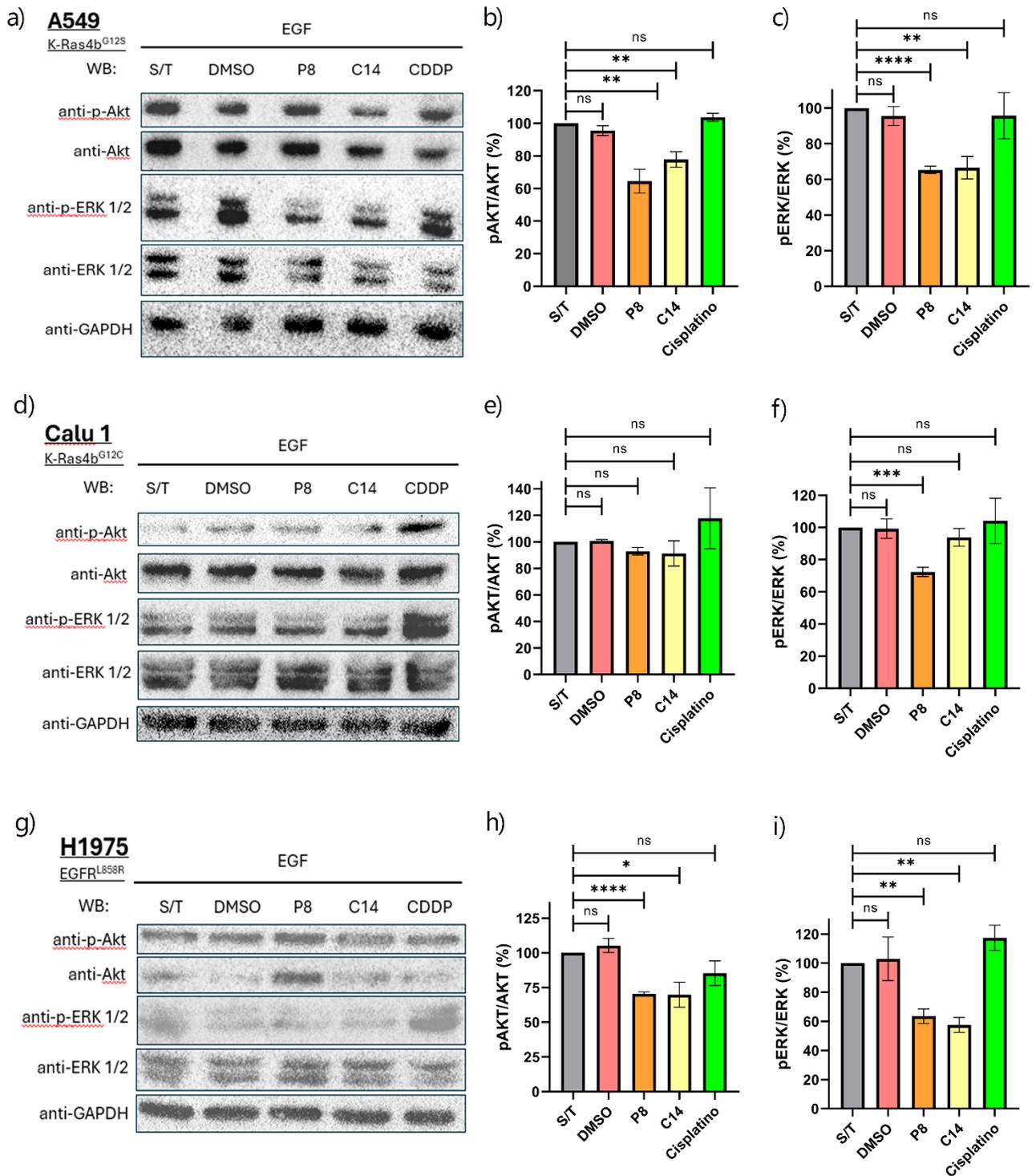


Figura 18 Efecto de los compuestos P8 y C14 sobre la fosforilación de ERK y AKT.

a) Representación de los inmunoblots de los extractos proteicos de la línea A549 (Kras4B^{G12S}), realizados en contra de las proteínas fosforiladas b) pAKT y c) pERK al ser retadas con los tratamientos P8, C14 y cisplatino

d) Representación de los inmunoblots de los extractos proteicos de la línea Calu1 (Kras4B^{G12C}), realizados en contra de las proteínas fosforiladas e) pAKT y f) pERK al ser retadas con los tratamientos P8, C14 y cisplatino g) Representación de los inmunoblots de los extractos proteicos de la línea H1975 (EGFR^{L858R,T790M}), realizados en contra de las proteínas fosforiladas h) pAKT y i) pERK al ser retadas con los tratamientos P8, C14 y cisplatino. Las líneas celulares fueron tratadas durante 3 horas con cisplatino y los compuestos P8 y C14 utilizando el IC₅₀ que se obtuvo a 72 horas, para posteriormente estimular con 100 ng/ml de EGF durante 10 minutos y realizar el protocolo de extracción de proteínas seguido del ensayo de Western Blot ambos detallados en materiales y métodos. Se utilizó como control del vehículo DMSO a una concentración final de 0.17% y como control negativo solamente se dejó intacto el cultivo de cada línea. Se detectaron los niveles de expresión de la proteína GAPDH como control de carga. Los resultados se graficaron utilizando la media \pm SEM de tres experimentos diferentes ($p^ < 0.05$, $p^{**} < 0.01$, $p^{***} < 0.001$, $p^{****} < 0.0001$ comparado al medio); ns, no significativo*

10.3. Evaluación sobre el tipo de muerte celular que promueven los compuestos P8 y C14 en las líneas celulares A549 (K-Ras4B^{G12S}), Calu1 (K-Ras4B^{G12C}) y H1975 (EGFR^{L858R,T790M}).

Después de haber observado una afectación en los niveles de expresión de ERK y AK por parte de los compuestos P8 y C14 en las líneas celulares: A549 (K-Ras4B^{G12S}), Calu1 (K-Ras4B^{G12C}) y H1975 (EGFR^{L858R,T790M}), se consideró indispensable evaluar si los compuestos P8 y C14 promovían la muerte celular. Esto se debe a que ERK y AKT están involucrados en la supervivencia celular al inhibir procesos pro-apoptóticos.

Para abordar este objetivo experimental se llevaron a cabo ensayos de muerte celular. Para estos ensayos se empleó el kit Cell Event Caspase 3/7 en conjunto con el reactivo Yoduro de Propidio para medir células vivas, apoptóticas y necróticas, mientras que el IC₅₀ que se utilizó con cada tratamiento (P8, C14 y cisplatino) durante 72 horas se muestra en la **tabla 7** para las líneas celulares de NSCLC; A549 (K-Ras4B^{G12S}), Calu1 (K-Ras4B^{G12C}) y H1975 (EGFR^{L858R,T790M}) (**figura 19**).

Los resultados en la línea A549 (K-Ras4B^{G12S}) mostraron que el compuesto P8 promueve la muerte celular por apoptosis en un 30.91%, caso contrario a la muerte por necrosis que tan solo tiene un porcentaje de 4.71% y el porcentaje restante de 64.48% pertenece a las células que sobrevivieron a este tratamiento (**figura 19d**). Por otro lado, el compuesto C14 provocó la muerte por apoptosis en un 42.19%, aunque también provocó la muerte por necrosis en un 20.47%

sugiriendo que las altas dosis de este compuesto provocan otros tipos de muerte celular, el porcentaje restante de 37.44% pertenece a las células que sobrevivieron a este tratamiento (**figura 19d**). Sin embargo, con el tratamiento con cisplatino se observó un 53.52% de muerte por apoptosis en conjunto con un 7.88% de muerte por necrosis, mientras que el porcentaje restante de 38.60% pertenece a las células que sobrevivieron a este tratamiento (**figura 19d**). Estos datos sugieren que P8 tiene un buen desempeño al promover la muerte por apoptosis sin detonar otro tipo de muerte en las células cancerosas, también el porcentaje de muerte que se obtuvo con el compuesto P8 es la mitad del porcentaje que se ha reportado con Sotorasib para esta misma línea (Barrios Bernal P *et al.*, 2023). En comparación, el compuesto C14 que provoca diferentes tipos de muerte celular además de la muerte por apoptosis. y los datos con cisplatino indican que este fármaco si produce muerte por necrosis a diferencia del compuesto P8 que no produce muerte por necrosis de manera significativa.

Para la línea Calu1 (K-Ras4B^{G12C}) los resultados mostraron que el compuesto P8 promueve la muerte por apoptosis en un 34.73%, mientras que el porcentaje de muerte por necrosis es despreciable al tener un porcentaje de 0.48% y el porcentaje de células que se mantuvieron vivas es de 64.89% (**figura 19e**). Por otro lado, el tratamiento con el compuesto C14 promueve la muerte por apoptosis en un 57.93%, caso contrario en la muerte por necrosis al tener un porcentaje de 18.90%, mientras que el porcentaje restante de 23.17% pertenece a las células que sobrevivieron a este tratamiento (**figura 19e**). Por otro lado, con el fármaco cisplatino se promueve la muerte por apoptosis en un 37.47% y de necrosis en un 6.32% mientras que el porcentaje restante de 56.21% pertenece a las células que sobrevivieron a este tratamiento (**figura 19e**). Por lo que estos resultados demuestran que el compuesto P8 no promueve otro tipo de muerte y el porcentaje de muerte por apoptosis es similar al que produce el fármaco cisplatino con la diferencia que el fármaco cisplatino es genotóxico (Vogel R *et al.*, 1991) mientras que el compuesto P8 no lo es (Briseño Diaz P *et al.*, 2023). Por otro lado, el compuesto C14, aunque promueve en mayor medida la muerte por apoptosis también promueve bastante la muerte por necrosis siendo este dato negativo para este fármaco.

Sin embargo para la línea H1975 (EGFR^{L858R,T790M}) los resultados mostraron que el tratamiento con el compuesto P8 promueve la muerte por apoptosis en un 52.53% en conjunto con un 10.25% de muerte por necrosis, mientras que el porcentaje restante de 37.28% es de las células que sobrevivieron a este tratamiento (**figura 19f**). Por otra parte, el tratamiento con el compuesto C14 induce la muerte por apoptosis en un 58.63% aunque también induce muerte por necrosis en un 5.55% que se considera no significativo, por otro lado, el porcentaje restante de 35.82% pertenece a las células que sobrevivieron a este tratamiento (**figura 19f**). En contraste a estos resultados el tratamiento con el agente quimioterapéutico cisplatino induce la muerte por apoptosis en un 65.5%, mientras que la muerte por necrosis es despreciable siendo este porcentaje de 0.39%, el porcentaje restante de 34.11% es de las células que sobrevivieron a este tratamiento (**figura 19f**). Estos datos sugieren los tres tratamientos (P8 C14 y Cisplatino) promueven la muerte por apoptosis en porcentajes similares, sin embargo ambos compuestos P8 y C14 también inducen otro tipo de muerte celular desde un 5% hasta un 10% por lo que cisplatino destaca en este aspecto al no promover otro tipo de muerte celular en esta línea celular.

Como conclusión de estos resultados, los compuestos P8 y C14 tienen un comportamiento similar entre las líneas A549 (K-Ras4B^{G12S}) y Calu 1 (K-Ras4B^{G12C}) que tienen mutación en K-Ras4B, el compuesto P8 provoca la muerte por apoptosis mientras evita que se induzca otro tipo de muerte celular en ambas líneas celulares. Por otro lado, el compuesto C14, aunque induce la muerte por apoptosis en mayor medida que el compuesto P8 también induce la muerte por necrosis. Aunque el fármaco cisplatino induce más la muerte por apoptosis en ambas líneas también induce otro tipo de muerte en un porcentaje bajo de hasta un 8% contrario al compuesto P8 que no induce otro tipo de muerte celular. En la línea H1975 que no tiene mutación en K-Ras4B ambos compuestos P8 y C14 inducen la muerte por apoptosis con valores similares al fármaco cisplatino, pero también inducen la muerte por necrosis hasta en un 10%, siendo el caso contrario al fármaco cisplatino que no induce otro tipo de muerte celular.

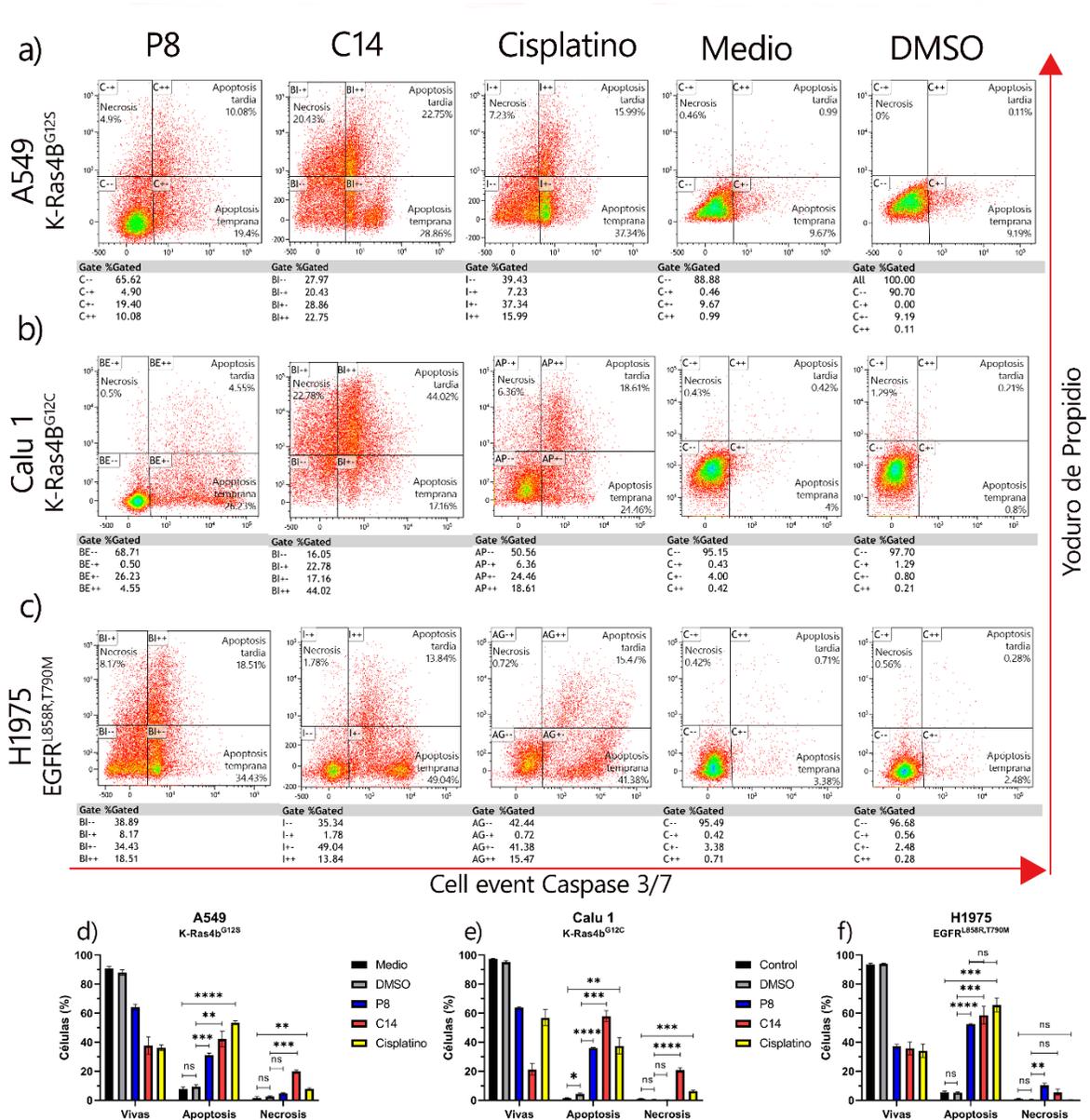


Figura 19 Los compuestos P8 y C14 inducen la muerte celular por apoptosis en líneas celulares con K-Ras mutado.

a) Análisis del diagrama de citometría de flujo con los tratamientos P8, C14, cisplatino, DMSO y medio representados en la parte superior de cada columna, mientras que en cada fila se presentan las líneas celulares de NSCLC; a) A549 Kras4B^{G12S}, b) Calu1 Kras4B^{G12C} y c) H1975 EGFR^{L858R,T790M}, el cuadrante I superior izquierdo (-+) muestra a las células muertas por necrosis, el cuadrante II superior derecho (++) muestra a las células muertas por apoptosis tardía, el cuadrante III inferior izquierdo (--) muestra a las células vivas y el cuadrante IV inferior derecho (+-) muestra a las células en etapas de apoptosis temprana. La evaluación del tipo de muerte por apoptosis o necrosis se llevó a cabo después de un periodo de incubación de 72 horas con los tratamientos (P8, C14, cisplatino, DMSO y medio). d) Representación gráfica de las células vivas, apoptóticas y necróticas en la línea celular A549 Kras4B^{G12S} en cada condición. e) Representación gráfica de las células vivas, apoptóticas y necróticas en la línea celular Calu1 Kras4B^{G12C} en cada condición. f)

Representación gráfica de las células vivas, apoptóticas y necróticas en la línea celular H1975 EGFR^{L858R,T790M} en cada condición. Los resultados se graficaron utilizando la media \pm SEM de tres experimentos diferentes ($p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$, $p^{***} < 0.001$, $p^{****} < 0.0001$ comparado al DMSO en caso de los compuestos P8 y C14 mientras que se comparó respecto al medio en el caso de cisplatino); ns, no significativo.

10.4. Evaluación del impacto de los compuestos P8 y C14 sobre la localización celular de la enzima PGK1 en las líneas celulares A549 (K-Ras4B^{G12S}), Calu1 (K-Ras4B^{G12C}) y H1975 (EGFR^{L858R,T790M}).

Se ha reportado que la enzima PGK1 participa en la reprogramación metabólica cuando transloca a la mitocondria de las líneas celulares U87, U251 de GBM y BxPc3, Panc1 de PDAC (Li X *et al.*, 2016). Por otro lado, se ha reportado que PGK1 en el núcleo promueve la metástasis en la línea celular BxPc3 de PDAC (Chen Liang *et al.*, 2019).

Para abordar si los compuestos P8 y C14 modifican la localización celular de PGK1 se llevaron a cabo ensayos de microscopía de fluorescencia confocal. Para estos ensayos se utilizó el IC₅₀ mostrado en la **tabla 7** durante 6 horas para cada tratamiento (P8 C14 y cisplatino) en las líneas celulares de NSCLC; Calu1 K-Ras4B^{G12C}, A549 K-Ras4B^{G12S} y H1975 EGFR^{L858R,T790M}

Para la línea A549 (K-Ras4B^{G12S}) los resultados sugieren que el compuesto P8 modifica la localización de PGK1 fuera de la mitocondria y del núcleo por que podría estar impactando a nivel metabólico (**figura 22Ad**), por otro lado, el compuesto C14 no afecta la localización de PGK1 (**figura 22Bd**), aunque pareciera que reduce la cantidad de PGK1 en la célula, mientras que el fármaco cisplatino no parece afectar la localización celular de PGK1 (**figura 22Cd**) siendo muy similar en cuanto a condiciones fisiológicas (**figura 22Ed**).

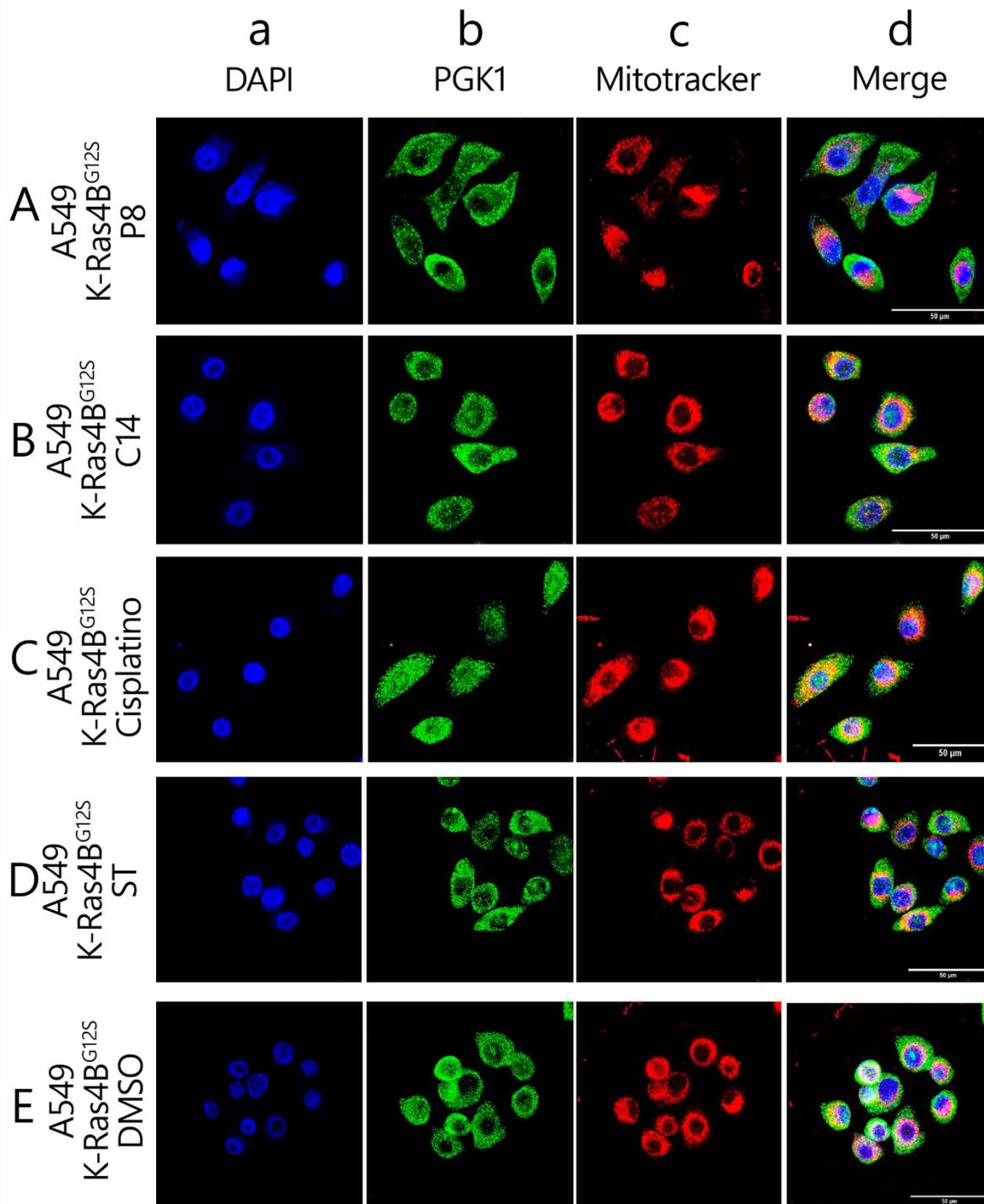


Figura 20 Efecto de los tratamientos con P8, C14 y cisplatino sobre la localización celular de PGK1 en la línea celular A549 Kras4B^{G12S}. Tu figura debería estar al mismo aumento .los controles tienen maas aumento

Microscopia confocal adquirida después de 6 horas de tratamiento con los compuestos A) P8, B) C14, C) cisplatino, D) DMSO y E) medio sobre la línea celular de NSCLC A549 Kras4B^{G12S}. La primera columna a) muestra en azul el núcleo celular teñido con DAPI. La segunda columna b) muestra en verde la proteína PGK1 teñida con Alexa 488. La tercera columna c) muestra en rojo la mitocondria teñida con MitoTracker Red

CMXRos. La cuarta columna d) muestra el merge de todas las inmunofluorescencias en conjunto con el campo claro. Todas las imágenes tienen una proyección Z a máxima intensidad.

En cuanto a la línea Calu1 (K-Ras4B^{G12C}) los resultados sugieren el compuesto P8 reduce la localización de PGK1 fuera del núcleo y pareciera que también reduce la localización de PGK1 en la mitocondria por lo que podría estar teniendo un efecto a nivel metabólico en la célula (**figura 23Ad**), mientras que el compuesto C14 parece que está reduciendo la localización celular de PGK1 en el núcleo pero no estaría afectando la localización en la mitocondria por lo que podría estar afectando la capacidad metastásica (**figura 23Bd**), esta conclusión se debe a que se ha observado la función de PGK1 en el núcleo como represor del promotor de E-cadherina (Liang C *et al.*, 2018), por otro lado el fármaco cisplatino si está impactando en la localización mitocondrial y nuclear de PGK1, esto sugiere que cisplatino podría estar afectando la migración y el metabolismo (**figura 23Cd**) De manera fisiológica la enzima PGK1 se encuentra en la mitocondria e importantemente en el núcleo para esta línea celular (**figura 23Ed**).

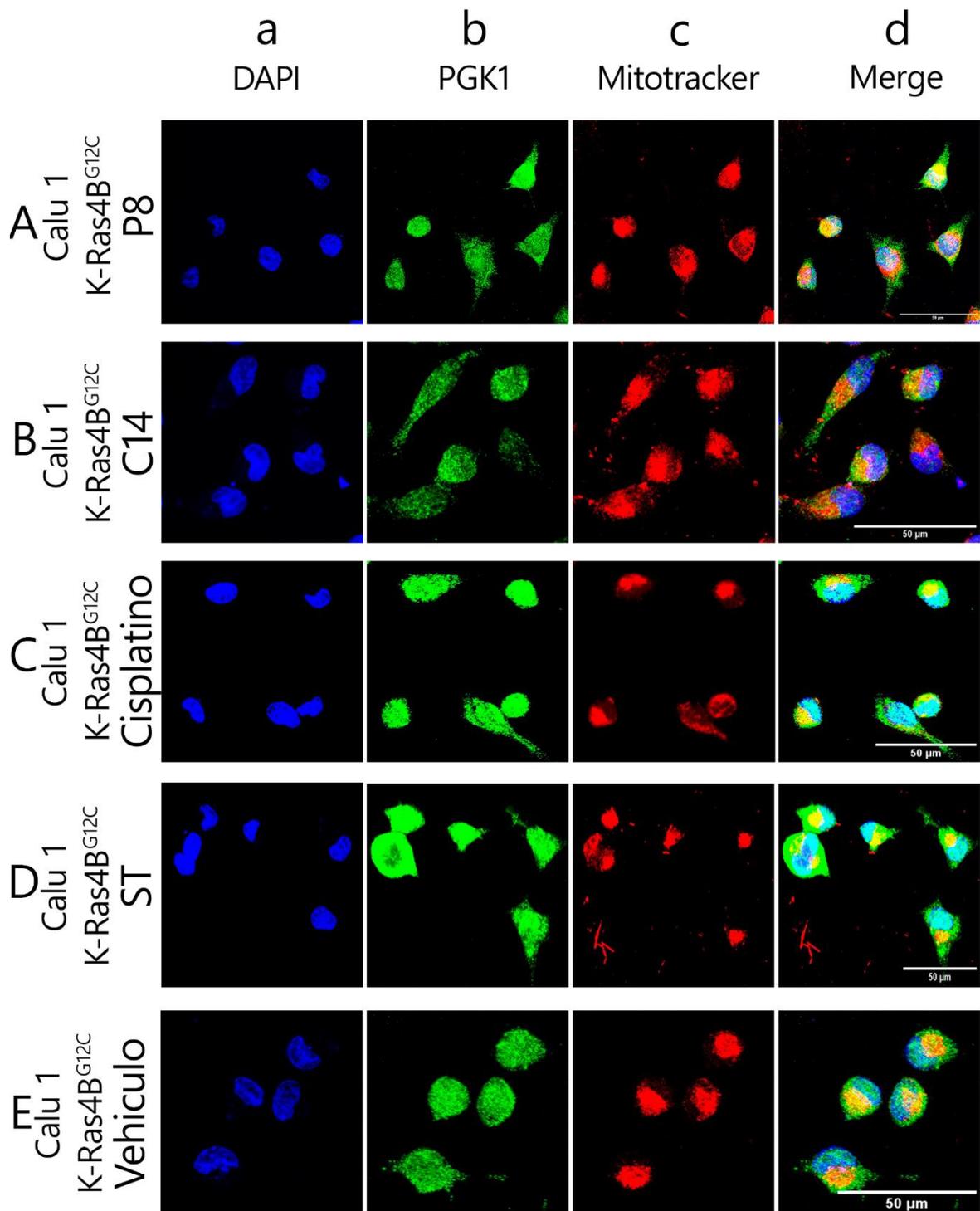


Figura 21 Efecto de los tratamientos con P8, C14 y cisplatino sobre la localización celular de PGK1 en la línea celular Calu1 Kras4B^{G12C}.

Microscopia confocal adquirida después de 6 horas de tratamiento con los compuestos A) P8, B) C14, C) cisplatino, D) DMSO y E) medio sobre la línea celular de NSCLC A549 Kras4B^{G12S}. La primera columna a)

muestra en azul el núcleo celular teñido con DAPI. La segunda columna b) muestra en verde la proteína PGK1 teñida con Alexa 488. La tercera columna c) muestra en rojo la mitocondria teñida con MitoTracker Red CMXRos. La cuarta columna d) muestra el merge de todas las inmunofluorescencias en conjunto con el campo claro. Todas las imágenes tienen una proyección Z a máxima intensidad.

Mientras tanto en la línea H1975 (EGFR^{L858R,T790M}) los resultados sugieren que el tratamiento con el compuesto P8 (**figura 24Ad**), el tratamiento con el compuesto C14 (**figura 24Bd**) y el tratamiento con cisplatino (**figura 24Cd**) no repercuten en la localización celular de PGK1 tanto en núcleo como en la mitocondria.

A manera de conclusión los resultados sugieren que P8 tiene un importante impacto sobre la localización celular de PGK1 en la línea A549 (K-Ras4B^{G12S}) y de menor medida en la línea Calu1 (K-Ras4B^{G12C}) mientras que ninguna afectación en la línea H1975 (EGFR^{L858R,T790M}). El compuesto C14 parece no tener un impacto sobre la localización celular de PGK1 tan destacable en las líneas A549 (K-Ras4B^{G12S}) y Calu1 (K-Ras4B^{G12C}) en cambio en la línea celular H1975 (EGFR^{L858R,T790M}) no estaría teniendo un impacto y por último, el fármaco cisplatino solamente muestra estar teniendo un impacto sobre la localización celular de PGK1 en la línea Calu1 (K-Ras4B^{G12C}) mientras que las otras dos líneas A549 (K-Ras4B^{G12S}) y H1975 (EGFR^{L858R,T790M}) no estaría tendiendo un impacto sobre la localización celular de PGK1. Cabe aclarar que para obtener datos cuantitativos y confirmar estas suposiciones se debe realizar Wester Blots de cada línea fraccionando los extractos celulares en núcleo, mitocondria y citoplasma.

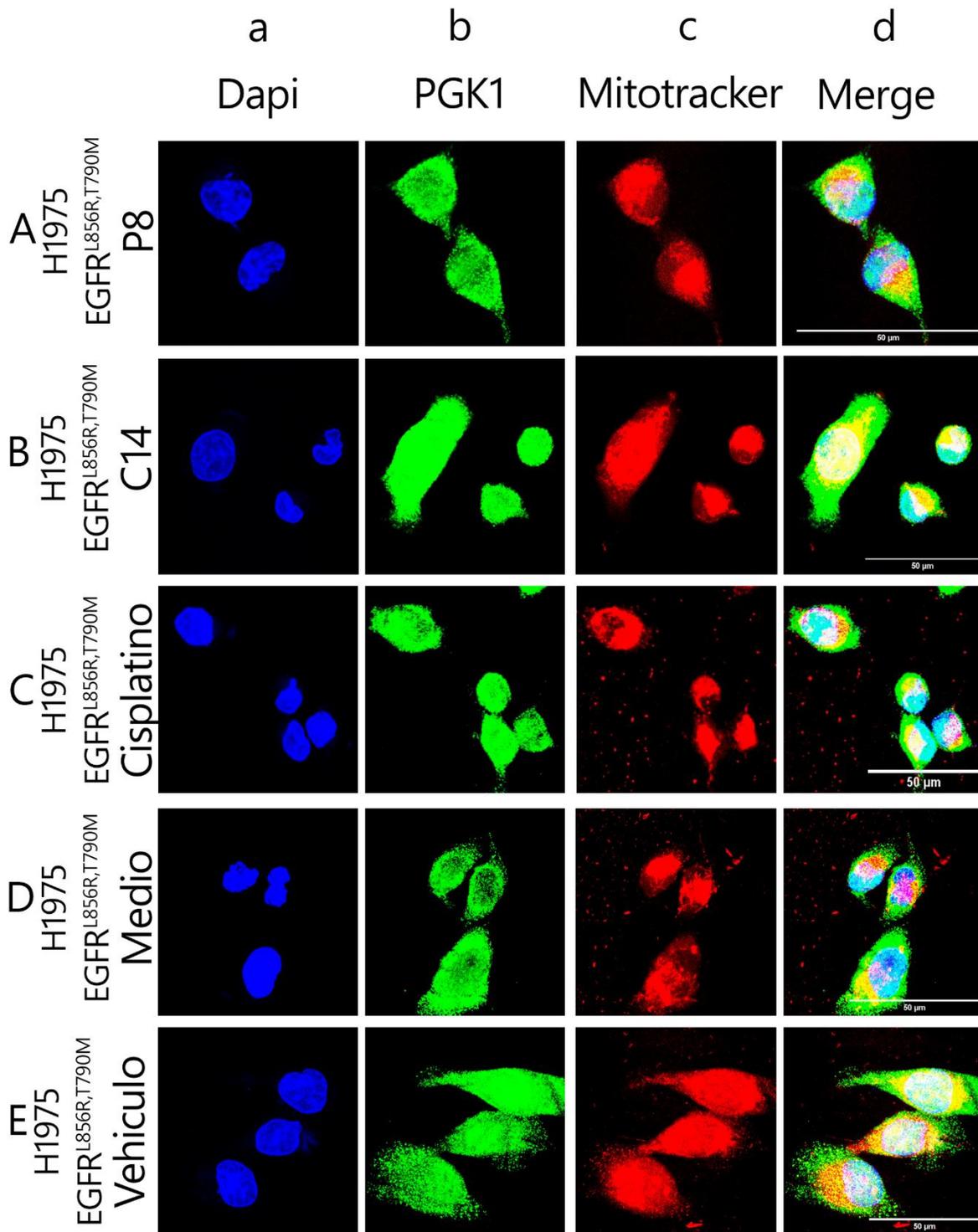


Figura 22 Efecto de los tratamientos P8, C14 y cisplatino sobre la localización celular de PGK1 en la línea celular H1975 EGFR^{L856R,T790M}.

Microscopia confocal adquirida después de 6 horas de tratamiento con los compuestos A) P8, B) C14, C) cisplatino, D) DMSO y E) medio sobre la línea celular de NSCLC A549 Kras4B^{G12S}. La primera columna a)

muestra en azul el núcleo celular teñido con DAPI. La segunda columna b) muestra en verde la proteína PGK1 teñida con Alexa 488. La tercera columna c) muestra en rojo la mitocondria teñida con MitoTracker Red CMXRos. La cuarta columna d) muestra el merge de todas las inmunofluorescencias en conjunto con el campo claro. Todas las imágenes tienen una proyección Z a máxima intensidad.

11. Discusión

Aunque ya se ha estudiado el efecto antineoplásico de los compuestos P8 y C14 tanto en PDAC como en cáncer de mama triple negativo con mutantes de K-Ras4B, es hasta este trabajo en el que se estudió por primera vez el efecto antineoplásico de los compuestos P8 y C14 sobre tres líneas de cáncer de pulmón de células no pequeñas; A549 (K-Ras4B^{G12S}), Calu1 (K-Ras4B^{G12C}) y H1975 (EGFR^{L858R,T790M}).

Este estudio es importante ya que actualmente existen muy pocos tratamientos que tengan como blanco farmacológico a K-Ras4B oncogénico. En el mercado existen dos que ya han sido aprobados por la FDA para su uso clínico los cuales son Sotorasib y Adragasib, mientras que existen en desarrollo otros fármacos como: Deltarasin, Simvastatin, Avicin G y Lupeol que están siendo evaluados en cáncer de pulmón de células no pequeñas con mutaciones en K-Ras4B. Los dos fármacos que ya han sido aprobados tienen la misma problemática que tienen la mayoría de los fármacos antineoplásicos, las células cancerosas adquieren resistencia a estos fármacos y es por esta problemática que es imperioso encontrar nuevos tratamientos que puedan minimizar la adquisición de resistencia al punto de evitarlo.

Debido a lo comentado anteriormente nuestro laboratorio evaluó dos compuestos llamados P8 y C14 con un enfoque novedoso ya que su blanco molecular es el complejo que se forma entre K-Ras4B^{mut}- PDE6δ. Este complejo participa en el transporte de K-Ras4B^{mut} hacia la membrana plasmática, por lo que el mecanismo de acción de ambos compuestos P8 y C14 es generar una grapa molecular con el complejo K-Ras4B^{mut}-PDE6δ evitando la liberación de K-Ras4B^{mut}

en la membrana celular de tal manera que se inhiba su señalización oncogénica rio abajo.

Con esta idea en mente y habiendo constatado que los compuestos P8 y C14 funcionaban exitosamente al detener el proceso oncogénico mediado por K-Ras4B^{G12C}, K-Ras4B^{G12V} y K-Ras4B^{G12D} en cáncer de páncreas (Briseño Diaz P et al., 2023) y K-Ras4B^{G13D} en cáncer de mama triple negativo (Carrión-Estrada DA et al 2024) se decidió probar en cáncer de pulmón.

Los ensayos de citotoxicidad demuestran que el compuesto P8 es mejor que el compuesto C14 en las líneas celulares con mutación en K-Ras4B que son A549 (K-Ras4B^{G12S}) y Calu1 (K-Ras4B^{G12C}), ya que P8 requiere la mitad de la concentración que requiere el compuesto C14 para reducir la viabilidad en un 50%. Aunque el compuesto P8 supera con creces al compuesto C14 en estas líneas de NSCLC, no llega a compararse con el fármaco Sotorasib que en estudios in vitro se han obtenido IC₅₀ desde 25 hasta 36 µM en la línea A549 (K-Ras4b^{G12S}) (Lanman BA et al 2020), mientras que en la línea celular Calu1 (K-Ras4b^{G12C}) el fármaco sotorasib disminuye la viabilidad hasta un 60% con una concentración de 0.5 µM (Lyu Y et al., 2021). De igual manera se evaluó el fármaco Adagrasib en un panel de líneas celulares con mutaciones en K-Ras4B y la concentración de IC₅₀ que cada línea celular requirió de este fármaco variaba dependiendo de la línea celular, estas concentraciones fueron de 10 nm hasta 973 nM (Hallin J et al., 2020).

Sin embargo, se ha demostrado que las concentraciones menores a 0.5% de DMSO aumentan la proliferación celular de células cancerosas de mama (Sangweni et al., 2021), por lo que, podría estar sucediendo algo similar en la línea celular Calu1 (K-Ras4B^{G12C}), este efecto podría estar contrarrestando el efecto antineoplásico de ambos compuestos en esta línea celular a bajas concentraciones. Por esta razón es importante evaluar el efecto antineoplásico de los compuestos P8 y C14 en su forma pre-farmacéutica para evitar cualquier efecto adicional que esté aportando el vehículo y así poder comparar de manera más precisa el efecto antineoplásico entre los compuestos P8 y C14 con el fármaco Sotorasib. Por otro lado, se ha observado un efecto similar en otras líneas de NSCLC con mutaciones

en K-Ras4B cuando se utiliza el fármaco Adagrasib disuelto en DMSO (Hallin J *et al.*, 2020).

Por otra parte, el efecto de resistencia que se observa en la línea celular Calu1 (K-Ras4B^{G12C}) también podría ser explicado debido a la presencia de una gran cantidad de transportadores como MRPs o ABCs que ya han sido reportados en la literatura (Bosquillon C, 2010) y que se han relacionado con la adquisición de resistencia contra diferentes tratamientos contra el cáncer (Sodani K *et al.*, 2012) (Bandi N *et al* 2002). En este caso estos transportadores podrían estar expulsando de las células al compuesto P8, al compuesto C14 y al fármaco cisplatino de esta línea celular.

Adicionalmente el comportamiento de ambos compuestos es completamente diferente entre diferentes tipos de cáncer y esto se refleja en la forma de la curva dosis respuesta. En la línea celular Calu1 (K-Ras4B^{G12C}) no se ve un efecto citotóxico a concentraciones menores a 70 μ M mientras que en la línea Mia PaCa 2 desde concentraciones menores a 10 μ M la viabilidad de esta línea cae abruptamente (Briseño Diaz P *et al.*, 2023). Esta tendencia de caer abruptamente se refleja en la línea Calu1 (K-Ras4B^{G12C}) a partir de 70 μ M, mientras que a concentraciones menores a 70 μ M se observa que esta misma línea celular presenta resistencia a los compuestos P8 y C14.

En otro punto, para comprender de mejor manera el funcionamiento de los compuestos P8 y C14, se probaron estos compuestos en una nueva mutante de K-Ras4B con mutación en G12S, ya que no se había estudiado el efecto de ambos compuestos en una línea con esta mutación y la línea A549 (K-Ras4B^{G12S}) es el primer acercamiento en cuanto al efecto de ambos compuestos sobre esta mutante.

Aunque el efecto citotóxico de P8 y C14 sobre la viabilidad celular de A549 (K-Ras4B^{G12S}) fue la mejor de entre las líneas celulares de NSCLC, la potencia de ambos compuestos es 4 veces menor en comparación con otras líneas celulares con diferentes mutaciones en K-Ras4B de PDAC (Briseño Diaz P *et al.*, 2023) y de cáncer de mama triple negativo (Carrión-Estrada DA *et al* 2024), esto podría deberse a que ambos compuestos sean menos afines a la mutación en G12S de K-

Ras4B, inclusive podría deberse a las propiedades celulares de estas líneas que parten de un origen pulmonar. Esta suposición es debido a que se ha reportado que en cáncer de pulmón de células no pequeñas existe una aberrante expresión de mucinas MUC1, MUC4 y MUC5a principalmente en adenocarcinoma pulmonar y en carcinoma de células escamosas (Lakshmanan *et al.*, 2015). Como dato relevante la línea celular A549 (K-Ras4B^{G12S}) pertenece a la clasificación de adenocarcinoma pulmonar mientras que la línea celular Calu1 (K-Ras4B^{G12C}) pertenecen a la clasificación de carcinoma de células escamosas. No sería extraño que ambas líneas tengan sobreexpresión de estas mucinas y que además estén participando en la adquisición de resistencia contra los compuestos P8 y C14, debido a que la subunidad MUC1-C participa en la activación de ERK, AKT, EMT y EGFR resultando en la adquisición de resistencia contra el fármaco Osimertinib que inhibe a EGFR^{mut} (Haratake N *et al.*, 2024) y pertenece a la clasificación de pequeñas moléculas como los compuestos P8 y C14. Por el contrario, el tratamiento Deltarasin no presenta esta resistencia y es dosis dependiente su reducción de la viabilidad en esta misma línea alcanzando un IC₅₀ de 5.29 μM, aunque también se observa un efecto citotóxico similar en líneas celulares no cancerosas de pulmón (Leung ELH *et al.*, 2018). En contraste el tratamiento Avicin G no bloquea el crecimiento de la línea celular A549 debido a que esta línea no es K-Ras4B oncodependiente (Garrido CM *et al.*, 2020), por lo que nuestros compuestos tienen un mejor desempeño que el compuesto Avicin G en la mutante de K-Ras4B^{G12S}.

Por otro lado los compuestos P8 y C14 también afectan la viabilidad de la línea celular H1975 (EGFR^{L858R,T790M}), aunque requieren concentraciones altas de hasta 150 μM aproximadamente. Esto sería lo que más me preocuparía las concentraciones tan altas de este compuesto. Este efecto citotóxico que se observa puede deberse a una interacción inespecífica de los compuestos P8 y C14 debido a una alta concentración por lo que estos datos concuerdan con lo observado en el trabajo de la Dra. Paola Briseño Díaz (Briseño Díaz P *et al.*, 2023). cuando se utilizaron concentraciones superiores a 150 μM en la línea HTER-HPNE que no tiene mutación en K-Ras4B y ambos compuestos disminuyeron la viabilidad celular un 50%.

Al ver la disminución en la viabilidad que provocaron los compuestos en las líneas celulares A549 (K-Ras4B^{G12S}), Calu1 (K-Ras4B^{G12C}) y H1975 (EGFR^{L858R,T790M}) lo más lógico era pensar que los compuestos estaban impidiendo que llegara K-Ras4B a la membrana y por consiguiente reducir la activación de los efectores río abajo de K-Ras como lo son el factor de transcripción ERK y la quinasa AKT que fosforila una gran cantidad de proteínas siendo ambas proteínas participes de procesos celulares relacionados a proliferación, crecimiento, supervivencia, resistencia a fármacos antineoplásicos, entre otros (Salgia R *et al.*, 2021).

Es debido a este cuestionamiento que se evaluó el efecto de los compuestos P8 y C14 sobre la activación de ERK y AKT dando como resultado una validación del efecto de estos compuestos sobre la activación de los efectores ERK y AKT en las líneas celulares A549 (K-Ras4B^{G12S}), Calu1 (K-Ras4B^{G12C}) y H1975 (EGFR^{L858R,T790M}).

Ambos compuestos P8 y C14 reducen los niveles de expresión de ambos efectores fosforilados con excepción de Calu1 (K-Ras4B^{G12C}) en donde solamente se presenta una reducción de ERK fosforilado y no de AKT fosforilado, esto puede deberse a que las mutantes de K-Ras^{G12C} en cáncer de pulmón no dependen de la activación de AKT y más bien activan la vía de RAL (Ihle NT *et al.* 2012), la activación de la vía de Ral está reportada en cáncer de pulmón y participa en progresión oncogénica, migración, invasión y metástasis (Moghadam *et al.*, 2017). En la línea A549 (K-Ras4B^{G12S}) la reducción es del 40% en ambos efectores pERK y pAKT lo que nos sugiere que ambos compuestos si están afectando desde un inicio las vías de señalización asociadas a estos efectores, sin embargo, se ha reportado que el uso de sotorasib en esta misma línea celular no reduce la activación de AKT por lo que los compuestos P8 y C14 son mejores en este aspecto. Adicionalmente la reducción de pERK y pAKT que se observa en la línea celular H1975 (EGFR^{L858R,T790M}) sugiere que los compuestos P8 y C14 tienen una interacción inespecífica con K-Ras4B^{WT} que culmina con la afectación en estas vías de señalización cuando se utilizan concentraciones superiores a 150 μ M que son consideradas altas al trabajar con líneas celulares. En cuanto a cisplatino (un agente alquilante) no se observó algún efecto en la activación de AKT y ERK en ninguna

de las líneas celulares, esto era esperado ya que su propósito es el de inhibir la síntesis de ADN produciendo enlaces cruzados dentro y entre las cadenas del ADN a través de la unión a todas las bases del ADN celular, con preferencia por la posición N-7 de guanina y adenosina (Dasari S & Tchounwou PB, 2014) y no afectar directamente las vías de señalización MAPK y AKT.

Una propuesta adicional y que parece viable es un efecto sinérgico entre los compuestos P8 o C14 con cisplatino resultando en un potente efecto antineoplásico sobre las líneas A549 (K-Ras4B^{G12S}), Calu1 (K-Ras4B^{G12C}) y H1975 (EGFR^{L858R,T790M}). Esto podría ser posible debido a que los compuestos P8 y C14 reducen la activación de AKT que está involucrada en supervivencia, crecimiento, metabolismo y adquisición de resistencia, está reportado en la literatura que la resistencia a cisplatino esta mediada por la vía de PI3K/AKT/NF-κB (Yu M et al., 2017). De tal manera que si los compuestos reducen la activación de AKT esto a su vez podría limitar la capacidad de la célula tumoral a responder contra el tratamiento de cisplatino.

Por otro lado, la afectación de ERK y AKT por parte de los compuestos P8 y C14 ocasionaron que las líneas celulares de cáncer de pulmón A549 (K-Ras4B^{G12S}), Calu1 (K-Ras4B^{G12C}) y H1975 (EGFR^{L858R,T790M}) tuvieran una muerte celular mediada por apoptosis de más de un 30%, valor que es superior al reportado con el uso del compuesto Lupeol en la línea A549 al tener un valor de 14.12% además de tener un valor de muerte por necrosis de 5.29% (Aborehab NM *et al.*, 2023), sugiriendo que nuestros compuestos provocan una mayor muerte celular por apoptosis y menor muerte celular por necrosis. El porcentaje de muerte por apoptosis en todas las líneas celulares fue mayor con cisplatino, por lo que si se utiliza el tratamiento de cisplatino en combinación con P8 o C14 el porcentaje de muerte celular debería ser superior ya que ambos tratamientos se complementarían. De tal forma que los compuestos inhiben AKT y ERK provocando la muerte celular por apoptosis y el cisplatino dañaría el ADN provocando de igual forma la muerte celular por apoptosis. Esta propuesta debe ser analizada e investigada debido a que el tratamiento estándar en cáncer de pulmón fase 3 es una combinación entre el quimioterapéutico cisplatino y una terapia dirigida. En el caso de cáncer de pulmón

fase 3 con mutación en K-Ras4B se podría llegar a utilizar en un futuro el compuesto P8 en conjunto con cisplatino como terapia de primera línea.

Por otro lado la administración de los compuestos P8 y C14 en las líneas celulares Calu1 (K-Ras4B^{G12C}) y H1975 (EGFR^{L858R,T790M}) no arrojaron resultados claros sobre el impacto de estos compuestos sobre la localización celular de la enzima PGK1 por lo que se recomendaría realizar Western Blot de extractos fraccionados para medir el cambio en la expresión y localización celular de esta proteína, ya que en las imágenes de microscopia si se perciben ciertos cambios tanto en la cantidad de PGK1 en núcleo y mitocondria como se observa en la (**Fig. 21Ad**) y en la (**Fig. 21Bd**).

En contraste, la administración del compuesto P8 en la línea celular A549 (K-Ras4B^{G12S}) si mostró cambios visibles en la localización celular de PGK1 al inhibir la translocación de esta enzima en la mitocondria y en el núcleo sugiriendo que el compuesto P8 está afectando la fosforilación de PGK1 indirectamente al reducir los niveles de expresión de pERK y por consiguiente podría estar evitando su entrada a la mitocondria. De igual manera, es probable que la modificación en la localización de PGK1 esté alterando el metabolismo de la línea A549 (K-Ras4B^{G12S}) disminuyendo el efecto Warburg y promoviendo la oxidación fosforilativa como se observó en trabajo del Dr. Li cuando se inhibe la translocación de PGK1 a la mitocondria (Li X *et al.*, 2016). Por el contrario, en esta misma línea celular A549 (K-Ras4B^{G12S}) el compuesto C14 no generó algún efecto visible sobre la localización celular de PGK1, al igual que el fármaco cisplatino que tampoco mostró algún impacto en la localización celular de PGK1. Sin embargo, en la línea celular Calu1 (K-Ras4B^{G12C}) si se observa una disminución de la localización de PGK1 por parte del tratamiento con cisplatino, aunque para corroborar estos resultados se requiere realizar Western Blots de extractos celulares fraccionados para determinar si hay un efecto cuantitativo sobre la localización celular y los niveles de expresión de PGK1 en las líneas celulares de NSCLC tratadas con estos nuevos compuestos.

Debido a que el efecto antineoplásico de ambos compuestos es inferior al de su contraparte en PDAC, es necesario detectar si de entre los 38 compuestos entrecruzadores del complejo Kras4B/PDE6δ (**Tabla 8**) se encuentra alguno que

tenga un mejor desempeño antineoplásico en las células cancerosas pulmonares con mutaciones en K-Ras4B en comparación con los compuestos P8 y C14.

Debido a que el compuesto P8 destaca por encima del compuesto C14, se podrían buscar análogos del compuesto P8 y probarlos en las líneas de NSCLC; A549 (K-Ras4B^{G12S}) y Calu1 (K-Ras4B^{G12C}) con el fin de encontrar un nuevo compuesto antineoplásico superior a lo observado con el compuestos P8.

Compuesto	ID Enamine		Compuesto	ID Enamine		Compuesto	ID Enamine
D1	Z52714899		C1	Z146241516		C15	Z52736477
D2	Z56794607		C2	Z90250319		C16	Z202373826
D3	Z51185275		C3	Z105370208		C17	Z46406207
D4	Z104377870		C4	Z607177054		C18	Z106459694
D5	Z90661758		C5	Z786305506		C19	Z44521301
D6	Z44508405		C6	Z234893597		C20	Z232357168
D7	Z118602326		C7	Z31349966		C21	Z126042658
D8	Z56779938		C8	Z28853604		C22	Z199813680
D9	Z14925758		C9	Z65211380		C23	Z89124359
D10	Z25944554		C10	Z27304548		C24	Z52853441
D11	Z27029312		C11	Z46393258			
D12	Z31372014		C12	Z106335952			
D13	Z105308834		C13	Z235938578			
D14	Z46515334		C14	Z105700580			

Tabla 8 Lista de los compuestos analizados por la Dra. Diana Casique Aguirre.

12. Conclusiones

- Ambos compuestos P8 y C14 presentan un efecto antineoplásico en las líneas celulares de NSCLC; A549 (K-Ras4B^{G12S}) y Calu1 (K-Ras4B^{G12C}).
- El efecto antineoplásico de los compuestos P8 y C14 se debe a la reducción en la activación de ERK y AKT lo que provoca la muerte celular por apoptosis en las líneas de cáncer de pulmón de células no pequeñas con mutaciones en K-Ras4B.

- El compuesto P8 reduce la translocación de PGK1 en las líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas con mutaciones en K-Ras4B.

13. Perspectivas

- Debido al efecto antineoplásico de P8 observado en las líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas con mutaciones en K-Ras4B G12C y G12S es necesario evaluar si existe un efecto sinérgico entre el compuesto P8 y el fármaco cisplatino debido a que en estadios avanzados de la enfermedad se utilizan terapias conjuntas con cisplatino.
- Dado que el compuesto P8 mostró un efecto antineoplásico es necesario evaluar los 38 compuestos originales de la Dra. Diana Casique Aguirre y los 40 compuestos análogos del compuesto C14 de la Dra. Paola Briseño Diaz en las líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas con mutaciones en K-Ras4B G12C y G12S, esto con el fin de encontrar un compuesto que tenga propiedades antineoplásicas superiores al compuesto P8.
- Se podría considerar continuar este trabajo hacia ensayos en modelos murinos con el fin de evaluar el potencial efecto antitumoral del compuesto P8.

14. Modelo biológico

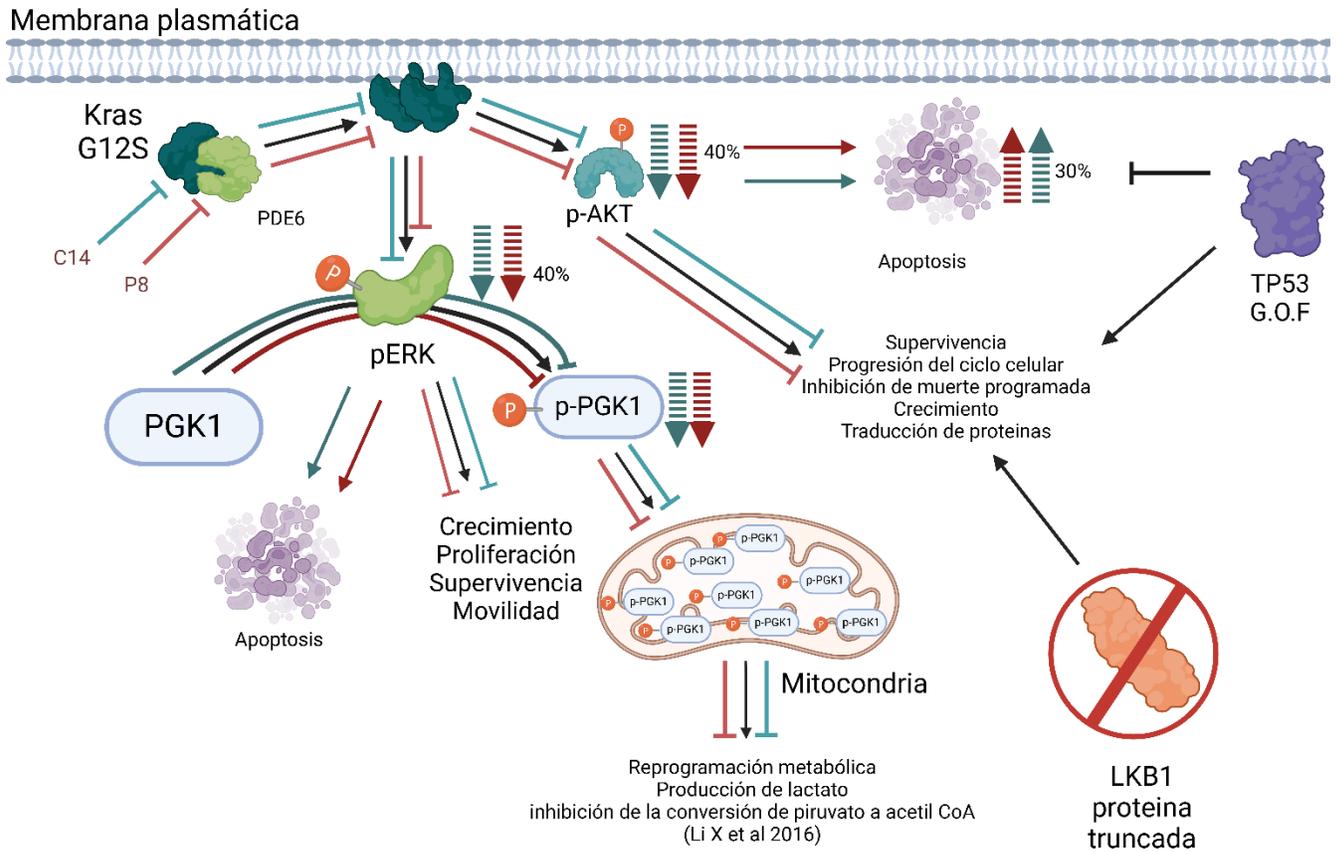


Figura 23 Modelo celular del funcionamiento del compuesto P8 y C14 en la línea celular A549 ($K\text{-Ras4B}^{G12S}$) de cáncer de pulmón de células no pequeñas.

La imagen muestra como la estabilización del complejo $K\text{-Ras4B-PDE6}$ por acción de los compuestos P8 y C14 evitan el anclaje de $K\text{-Ras4B}^{G12S}$ a la membrana plasmática, por lo que afecta la activación de ERK y AKT resultando en muerte celular por apoptosis y en la inhibición de la fosforilación de la enzima PGK1.

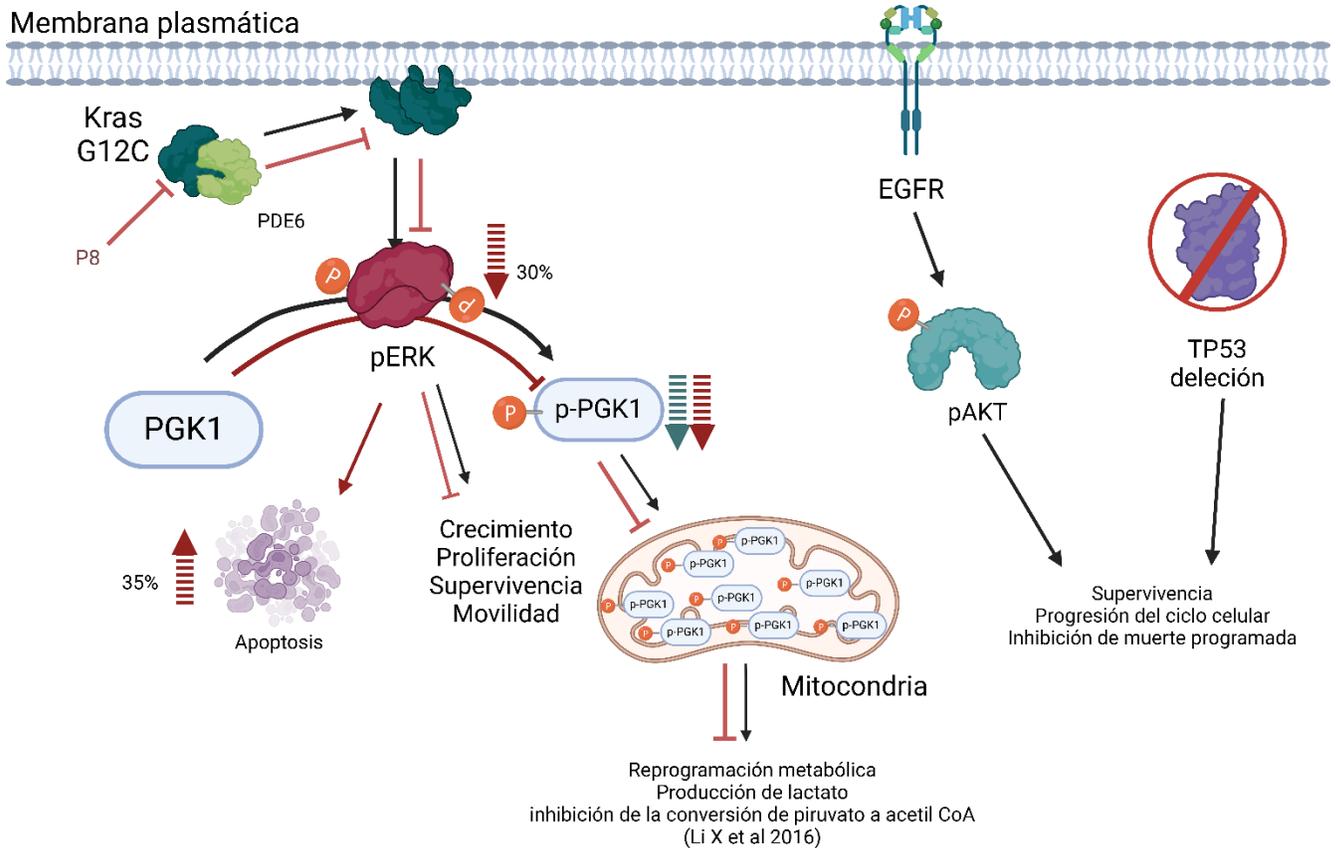


Figura 24 Modelo celular del funcionamiento del compuesto P8 en la línea celular Calu1 (K-Ras4B^{G12C}) de cáncer de pulmón de células no pequeñas.

La imagen muestra como la estabilización del complejo K-Ras4B-PDE6 por acción del compuesto P8 evita el anclaje de K-Ras4B^{G12C} a la membrana plasmática, por lo que afecta la activación de ERK y AKT resultando en muerte celular por apoptosis y en la inhibición de la fosforilación de la enzima PGK1.

15. Bibliografía

1. Abidi Y, Fekete M, Farkas Á, Horváth A, Varga JT. Effectiveness and quality of life in lung cancer, pre-, post- and perioperative rehabilitation - A review. *Physiol Int.* 2023 May 26. doi: 10.1556/2060.2023.00237. Epub ahead of print. PMID: 37235454.
2. Aborehab NM, Salama MM, Ezzat SM. A novel lupene derivative from *Thymus capitatus* possesses an apoptosis-inducing effect via Let-7

- miRNA/Cyclin D1/VEGF cascade in the A549 cell line. *BMC Complement Med Ther.* 2023 Oct 16;23(1):365. doi: 10.1186/s12906-023-04201-7. PMID: 37845669; PMCID: PMC10577955.
3. Altorki NK, Markowitz GJ, Gao D, Port JL, Saxena A, Stiles B, McGraw T, Mittal V. The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth and metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2019 Jan;19(1):9-31. doi: 10.1038/s41568-018-0081-9. PMID: 30532012; PMCID: PMC6749995.
 4. American Cancer Society. Lung Cancer Diagnosis. <https://www.cancer.org/cancer/lung-cancer/detection-diagnosis-staging/how-diagnosed.html>
 5. Assi HI, Zerdan MB, Hodroj M, Khoury M, Naji NS, Amhaz G, Zeidane RA, El Karak F. Value of chemotherapy post immunotherapy in stage IV non-small cell lung cancer (NSCLC). *Oncotarget.* 2023 May 26;14:517-525. doi: 10.18632/oncotarget.28444. PMID: 37235814.
 6. Aubrey BJ, Strasser A, Kelly GL. Tumor-Suppressor Functions of the TP53 Pathway. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016 May 2;6(5):a026062. doi: 10.1101/cshperspect.a026062. PMID: 27141080; PMCID: PMC4852799.
 7. Ayeni D, Miller B, Kuhlmann A, Ho PC, Robles-Oteiza C, Gaefele M, Levy S, de Miguel FJ, Perry C, Guan T, Krystal G, Lockwood W, Zelterman D, Homer R, Liu Z, Kaech S, Politi K. Tumor regression mediated by oncogene withdrawal or erlotinib stimulates infiltration of inflammatory immune cells in EGFR mutant lung tumors. *J Immunother Cancer.* 2019 Jul 10;7(1):172. doi: 10.1186/s40425-019-0643-8. PMID: 31291990; PMCID: PMC6617639.
 8. Bai Y, Zhang M, Sanderson MJ. Contractility and Ca²⁺ signaling of smooth muscle cells in different generations of mouse airways. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007 Jan;36(1):122-30. doi: 10.1165/rcmb.2006-0036OC. Epub 2006 Aug 24. PMID: 16931808; PMCID: PMC1899303.
 9. Bandi N, Kompella UB. Budesonide reduces multidrug resistance-associated protein 1 expression in an airway epithelial cell line (Calu-1). *Eur J Pharmacol.* 2002;437(1-2):9-17. doi:10.1016/s0014-2999(02)01267-0 Barrios-Bernal P,

- Lucio-Lozada J, Ramos-Ramírez M, Hernández-Pedro N, Arrieta O. A Novel Combination of Sotorasib and Metformin Enhances Cytotoxicity and Apoptosis in KRAS-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines through MAPK and P70S6K Inhibition. *Int J Mol Sci.* 2023 Feb 22;24(5):4331. doi: 10.3390/ijms24054331. PMID: 36901764; PMCID: PMC10001819.
10. Barrios-Bernal P, Lucio-Lozada J, Ramos-Ramírez M, Hernández-Pedro N, Arrieta O. A Novel Combination of Sotorasib and Metformin Enhances Cytotoxicity and Apoptosis in KRAS-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines through MAPK and P70S6K Inhibition. *Int J Mol Sci.* 2023 Feb 22;24(5):4331. doi: 10.3390/ijms24054331. PMID: 36901764; PMCID: PMC10001819.
 11. Bauman JE, Eaton KD, Wallace SG, Carr LL, Lee SJ, Jones DV, Arias-Pulido H, Cerilli LA, Martins RG. A Phase II study of pulse dose imatinib mesylate and weekly paclitaxel in patients aged 70 and over with advanced non-small cell lung cancer. *BMC Cancer.* 2012 Oct 3;12:449. doi: 10.1186/1471-2407-12-449. PMID: 23033932; PMCID: PMC3517479.
 12. Bhatt M, Patel M, Adnan M, Reddy MN. Anti-Metastatic Effects of Lupeol via the Inhibition of MAPK/ERK Pathway in Lung Cancer. *Anticancer Agents Med Chem.* 2021;21(2):201-206. doi: 10.2174/1871520620666200424131548. PMID: 32329697.
 13. Bingle L, Bull TB, Fox B, Guz A, Richards RJ, Tetley TD. Type II pneumocytes in mixed cell culture of human lung: a light and electron microscopic study. *Environ Health Perspect.* 1990 Apr;85:71-80. doi: 10.1289/ehp.85-1568322. PMID: 2384069; PMCID: PMC1568322.
 14. Booth L, Roberts JL, Tavallai M, Chuckalovcak J, Stringer DK, Koromilas AE, Boone DL, McGuire WP, Poklepovic A, Dent P. [Pemetrexed + Sorafenib] lethality is increased by inhibition of ERBB1/2/3-PI3K-NFκB compensatory survival signaling. *Oncotarget.* 2016 Apr 26;7(17):23608-32. doi: 10.18632/oncotarget.8281. PMID: 27015562; PMCID: PMC5029651.

15. Bosquillon C. Drug transporters in the lung--do they play a role in the biopharmaceutics of inhaled drugs? *J Pharm Sci.* 2010 May;99(5):2240-55. doi: 10.1002/jps.21995. PMID: 19950388.
16. Brandt JP, Mandiga P. Histology, Alveolar Cells. 2022 Sep 4. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. PMID: 32491474.
17. Briseño-Díaz P, Schnoor M, Bello-Ramirez M, Correa-Basurto J, Rojo-Domínguez A, Arregui L, Vega L, Núñez-González E, Palau-Hernández LA, Parra-Torres CG, García Córdova OM, Zepeda-Castilla E, Torices-Escalante E, Domínguez-Camacho L, Xoconostle-Cazares B, Meraz-Ríos MA, Delfín-Azuara S, Carrión-Estrada DA, Villegas-Sepúlveda N, Hernández-Rivas R, Thompson-Bonilla MDR, Vargas M. Synergistic effect of antagonists to KRas4B/PDE6 molecular complex in pancreatic cancer. *Life Sci Alliance.* 2023 Oct 9;6(12):e202302019. doi: 10.26508/lsa.202302019. PMID: 37813486; PMCID: PMC10561825.
18. Chaudhry R, Bordoni B. Anatomy, Thorax, Lungs. 2022 Jul 25. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. PMID: 29262068.
19. Carrión-Estrada DA, Aguilar-Rojas A, Huerta-Yepez S, Montecillo-Aguado M, Bello M, Rojo-Domínguez A, Arechaga-Ocampo E, Briseño-Díaz P, Meraz-Ríos MA, Thompson-Bonilla MDR, Hernández-Rivas R, Vargas M. Antineoplastic effect of compounds C14 and P8 on TNBC and radioresistant TNBC cells by stabilizing the K-Ras4B^{G13D}/PDE6 δ complex. *Front Oncol.* 2024 Mar 20;14:1341766. doi: 10.3389/fonc.2024.1341766. PMID: 38571493; PMCID: PMC10989073.
20. Cetintas VB, Kucukaslan AS, Kosova B, Tetik A, Selvi N, Cok G, Gunduz C, Eroglu Z. Cisplatin resistance induced by decreased apoptotic activity in non-small-cell lung cancer cell lines. *Cell Biol Int.* 2012 Mar 1;36(3):261-5. doi: 10.1042/CBI20110329. PMID: 22397496.
21. Chen J, Xu C, Lv J, Lu W, Zhang Y, Wang D, Song Y. Clinical characteristics and targeted therapy of different gene fusions in non-small cell lung cancer: a narrative review. *Transl Lung Cancer Res.* 2023 Apr 28;12(4):895-908. doi:

- 10.21037/tlcr-22-566. Epub 2023 Apr 3. PMID: 37197619; PMCID: PMC10183389.
21. Chiu CH, Ramesh S, Liao PH, Kuo WW, Chen MC, Kuo CH, Li CC, Wang TF, Lin YM, Lin YJ, Huang CY. Phosphorylation of Bcl-2 by JNK confers gemcitabine resistance in lung cancer cells by reducing autophagy-mediated cell death. *Environ Toxicol*. 2023 May 23. doi: 10.1002/tox.23836. Epub ahead of print. PMID: 37219008.
 22. Chmielik E, Rusinek D, Oczko-Wojciechowska M, Jarzab M, Krajewska J, Czarniecka A, Jarzab B. Heterogeneity of Thyroid Cancer. *Pathobiology*. 2018;85(1-2):117-129. doi: 10.1159/000486422. Epub 2018 Feb 6. PMID: 29408820.
 23. Coyne CP, Narayanan L. Gemcitabine-(5'-phosphoramidate)-[anti-IGF-1R]: molecular design, synthetic organic chemistry reactions, and antineoplastic cytotoxic potency in populations of pulmonary adenocarcinoma (A549). *Chem Biol Drug Des*. 2017 Mar;89(3):379-399. doi: 10.1111/cbdd.12845. Epub 2016 Dec 20. PMID: 27561602; PMCID: PMC5396302.
 24. Cristina López Alcalá. (2006). Regulación de K-Ras por Ca²⁺/CaM. Tesis para optar al grado de Doctor en Farmacia. Universitat de Barcelona. Barcelona
 25. Cruz-Nova P, Schnoor M, Correa-Basurto J, Bello M, Briseño-Díaz P, Rojo-Domínguez A, Ortiz-Mendoza CM, Guerrero-Aguirre J, García-Vázquez FJ, Hernández-Rivas R, Thompson-Bonilla MDR, Vargas M. The small organic molecule C19 binds and strengthens the KRAS4B-PDEδ complex and inhibits growth of colorectal cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *BMC Cancer*. 2018 Nov 1;18(1):1056. doi: 10.1186/s12885-018-4968-3. PMID: 30382908; PMCID: PMC6211466.
 26. Cucurull M, Notario L, Sanchez-Céspedes M, Hierro C, Estival A, Carcereny E, Saigí M. Targeting KRAS in Lung Cancer Beyond KRAS G12C Inhibitors: The Immune Regulatory Role of *KRAS* and Novel Therapeutic Strategies. *Front Oncol*. 2022 Jan 13;11:793121. doi: 10.3389/fonc.2021.793121. PMID: 35096591; PMCID: PMC8793278.

27. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2014 Oct 5;740:364-78. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025. Epub 2014 Jul 21. PMID: 25058905; PMCID: PMC4146684.
28. de Langen AJ, Johnson ML, Mazieres J, Dingemans AC, Mountzios G, Pless M, Wolf J, Schuler M, Lena H, Skoulidis F, Yoneshima Y, Kim SW, Linardou H, Novello S, van der Wekken AJ, Chen Y, Peters S, Felip E, Solomon BJ, Ramalingam SS, Dooks C, Lindsay CR, Ferreira CG, Blais N, Obiozor CC, Wang Y, Mehta B, Varrieur T, Ngarmchamnanrith G, Stollenwerk B, Waterhouse D, Paz-Ares L; CodeBreak 200 Investigators. Sotorasib versus docetaxel for previously treated non-small-cell lung cancer with KRAS^{G12C} mutation: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet.* 2023 Mar 4;401(10378):733-746. doi: 10.1016/S0140-6736(23)00221-0. Epub 2023 Feb 7. PMID: 36764316.
29. de Torres JP, Marín JM, Casanova C, Cote C, Carrizo S, Cordoba-Lanus E, Baz-Dávila R, Zulueta JJ, Aguirre-Jaime A, Saetta M, Cosio MG, Celli BR. Lung cancer in patients with chronic obstructive pulmonary disease--incidence and predicting factors. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011 Oct 15;184(8):913-9. doi: 10.1164/rccm.201103-0430OC. PMID: 21799072.
30. Drake, R. L., Vogl, W., & Mitchell, A. W. M. (2010). *Gray's anatomy for students.* Elsevier Health Sciences.
31. Drilon A, Camidge DR, Lin JJ, Kim SW, Solomon BJ, Dziadziuszko R, Besse B, Goto K, de Langen AJ, Wolf J, Lee KH, Popat S, Springfield C, Nagasaka M, Felip E, Yang N, Velcheti V, Lu S, Kao S, Dooks C, Krebs MG, Yao W, Beg MS, Hu X, Moro-Sibilot D, Cheema P, Stopatschinskaja S, Mehta M, Trone D, Graber A, Sims G, Yuan Y, Cho BC; TRIDENT-1 Investigators. Repotrectinib in *ROS1* Fusion-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2024 Jan 11;390(2):118-131. doi: 10.1056/NEJMoa2302299. PMID: 38197815.
32. Elshatlawy M, Sampson J, Clarke K, Bayliss R. EML4-ALK biology and drug resistance in non-small cell lung cancer: a new phase of discoveries. *Mol*

Oncol. 2023 May 7. doi: 10.1002/1878-0261.13446. Epub ahead of print. PMID: 37149843.

33. Ettinger DS, Wood DE, Aisner DL, Akerley W, Bauman JR, Bharat A, Bruno DS, Chang JY, Chirieac LR, D'Amico TA, DeCamp M, Dilling TJ, Dowell J, Gettinger S, Grotz TE, Gubens MA, Hegde A, Lackner RP, Lanuti M, Lin J, Loo BW, Lovly CM, Maldonado F, Massarelli E, Morgensztern D, Ng T, Otterson GA, Pacheco JM, Patel SP, Riely GJ, Riess J, Schild SE, Shapiro TA, Singh AP, Stevenson J, Tam A, Tanvetyanon T, Yanagawa J, Yang SC, Yau E, Gregory K, Hughes M. Non-Small Cell Lung Cancer, Version 3.2022, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2022 May;20(5):497-530. doi: 10.6004/jnccn.2022.0025. PMID: 35545176.
34. Fidler MJ, Shersher DD, Borgia JA, Bonomi P. Targeting the insulin-like growth factor receptor pathway in lung cancer: problems and pitfalls. *Ther Adv Med Oncol*. 2012 Mar;4(2):51-60. doi: 10.1177/1758834011427576. PMID: 22423264; PMCID: PMC3296080.
35. Gallego-Jara J, Lozano-Terol G, Sola-Martínez RA, Cánovas-Díaz M, de Diego Puente T. A Compressive Review about Taxol®: History and Future Challenges. *Molecules*. 2020 Dec 17;25(24):5986. doi: 10.3390/molecules25245986. PMID: 33348838; PMCID: PMC7767101.
36. Garon EB, Ciuleanu TE, Arrieta O, Prabhash K, Syrigos KN, Goksel T, Park K, Gorbunova V, Kowalyszyn RD, Pikiel J, Czyzewicz G, Orlov SV, Lewanski CR, Thomas M, Bidoli P, Dakhil S, Gans S, Kim JH, Grigorescu A, Karaseva N, Reck M, Cappuzzo F, Alexandris E, Sashegyi A, Yurasov S, Pérol M. Ramucirumab plus docetaxel versus placebo plus docetaxel for second-line treatment of stage IV non-small-cell lung cancer after disease progression on platinum-based therapy (REVEL): a multicentre, double-blind, randomised phase 3 trial. *Lancet*. 2014 Aug 23;384(9944):665-73. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60845-X. Epub 2014 Jun 2. PMID: 24933332.
37. Garrido CM, Henkels KM, Rehl KM, Liang H, Zhou Y, Gutterman JU, Cho KJ. Avicin G is a potent sphingomyelinase inhibitor and blocks oncogenic K- and

- H-Ras signaling. *Sci Rep.* 2020 Jun 4;10(1):9120. doi: 10.1038/s41598-020-65882-5. PMID: 32499517; PMCID: PMC7272413.
38. Gendarme S, Bylicki O, Chouaid C, Guisier F. *ROS-1* Fusions in Non-Small-Cell Lung Cancer: Evidence to Date. *Curr Oncol.* 2022 Jan 28;29(2):641-658. doi: 10.3390/currenocol29020057. PMID: 35200557; PMCID: PMC8870726.
 39. Giaccone G, He Y. Current Knowledge of Small Cell Lung Cancer Transformation from Non-Small Cell Lung Cancer. *Semin Cancer Biol.* 2023 May 25:S1044-579X(23)00078-0. doi: 10.1016/j.semcancer.2023.05.006. Epub ahead of print. PMID: 37244438.
 40. Global Cancer Observatory: Cancer Today. International Agency for Research on Cancer. Lyon, France. Available at: <http://gco.iarc.fr/today>.
 41. Gorsic LK, Stark AL, Wheeler HE, Wong SS, Im HK, Dolan ME. EPS8 inhibition increases cisplatin sensitivity in lung cancer cells. *PLoS One.* 2013 Dec 19;8(12):e82220. doi: 10.1371/journal.pone.0082220. PMID: 24367505; PMCID: PMC3868552.
 42. Haddad M, Sharma S. Physiology, Lung. 2022 Jul 18. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan–. PMID: 31424761.
 43. Haratake N, Ozawa H, Morimoto Y, Yamashita N, Daimon T, Bhattacharya A, Wang K, Nakashoji A, Isozaki H, Shimokawa M, Kikutake C, Suyama M, Hashinokuchi A, Takada K, Takenaka T, Yoshizumi T, Mitsudomi T, Hata AN, Kufe D. MUC1-C Is a Common Driver of Acquired Osimertinib Resistance in NSCLC. *J Thorac Oncol.* 2024 Mar;19(3):434-450. doi: 10.1016/j.jtho.2023.10.017. Epub 2023 Nov 3. PMID: 37924972; PMCID: PMC10939926.
 44. Hallin J, Engstrom LD, Hargis L, Calinisan A, Aranda R, Briere DM, Sudhakar N, Bowcut V, Baer BR, Ballard JA, Burkard MR, Fell JB, Fischer JP, Vigers GP, Xue Y, Gatto S, Fernandez-Banet J, Pavlicek A, Velastagui K, Chao RC, Barton J, Pierobon M, Baldelli E, Patricoin EF 3rd, Cassidy DP, Marx MA, Rybkin II, Johnson ML, Ou SI, Lito P, Papadopoulos KP, Jänne PA, Olson P, Christensen JG. The KRAS^{G12C} Inhibitor MRTX849 Provides Insight toward Therapeutic Susceptibility of KRAS-Mutant Cancers in Mouse Models and

- Patients. *Cancer Discov.* 2020 Jan;10(1):54-71. doi: 10.1158/2159-8290.CD-19-1167. Epub 2019 Oct 28. PMID: 31658955; PMCID: PMC6954325.
45. Hastie R, Lim E, Sluka P, Campbell L, Horne AW, Ellett L, Hannan NJ, Brownfoot F, Kaitu'u-Lino TJ, Tong S. Vinorelbine Potently Induces Placental Cell Death, Does Not Harm Fertility and is a Potential Treatment for Ectopic Pregnancy. *EBioMedicine.* 2018 Mar;29:166-176. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.01.041. Epub 2018 Feb 2. PMID: 29429891; PMCID: PMC5925452.
 46. Haunschild CE, Tewari KS. Bevacizumab use in the frontline, maintenance and recurrent settings for ovarian cancer. *Future Oncol.* 2020 Mar;16(7):225-246. doi: 10.2217/fon-2019-0042. Epub 2019 Nov 20. PMID: 31746224; PMCID: PMC7036749.
 47. Hausman DM. What Is Cancer? *Perspect Biol Med.* 2019;62(4):778-784. doi: 10.1353/pbm.2019.0046. PMID: 31761807.
 48. He Y, Luo Y, Zhang D, Wang X, Zhang P, Li H, Ejaz S, Liang S. PGK1-mediated cancer progression and drug resistance. *Am J Cancer Res.* 2019 Nov 1;9(11):2280-2302. PMID: 31815035; PMCID: PMC6895440.
 49. Hecht SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Jul 21;91(14):1194-210. doi: 10.1093/jnci/91.14.1194. PMID: 10413421.
 50. Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature.* 2018 Jan 24;553(7689):446-454. doi: 10.1038/nature25183. PMID: 29364287.
 51. Hu HF, Ye Z, Qin Y, Xu XW, Yu XJ, Zhuo QF, Ji SR. Mutations in key driver genes of pancreatic cancer: molecularly targeted therapies and other clinical implications. *Acta Pharmacol Sin.* 2021 Nov;42(11):1725-1741. doi: 10.1038/s41401-020-00584-2. Epub 2021 Feb 11. PMID: 33574569; PMCID: PMC8563973.
 52. Ihle NT, Byers LA, Kim ES, Saintigny P, Lee JJ, Blumenschein GR, Tsao A, Liu S, Larsen JE, Wang J, Diao L, Coombes KR, Chen L, Zhang S, Abdelmelek MF, Tang X, Papadimitrakopoulou V, Minna JD, Lippman SM,

- Hong WK, Herbst RS, Wistuba II, Heymach JV, Powis G. Effect of KRAS oncogene substitutions on protein behavior: implications for signaling and clinical outcome. *J Natl Cancer Inst.* 2012 Feb 8;104(3):228-39. doi: 10.1093/jnci/djr523. Epub 2012 Jan 13. PMID: 22247021; PMCID: PMC3274509.
53. Inamura K. Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification. *Front Oncol.* 2017 Aug 28;7:193. doi: 10.3389/fonc.2017.00193. PMID: 28894699; PMCID: PMC5581350.
54. Infante Lara L, Fenner S, Ratcliffe S, Isidro-Llobet A, Hann M, Bax B, Osheroff N. Coupling the core of the anticancer drug etoposide to an oligonucleotide induces topoisomerase II-mediated cleavage at specific DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 2018 Mar 16;46(5):2218-2233. doi: 10.1093/nar/gky072. PMID: 29447373; PMCID: PMC5861436.
55. Jänne PA, Riely GJ, Gadgeel SM, Heist RS, Ou SI, Pacheco JM, Johnson ML, Sabari JK, Leventakos K, Yau E, Bazhenova L, Negrao MV, Pennell NA, Zhang J, Anderes K, Der-Torossian H, Kheoh T, Velastegui K, Yan X, Christensen JG, Chao RC, Spira AI. Adagrasib in Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring a *KRAS*G12C Mutation. *N Engl J Med.* 2022 Jul 14;387(2):120-131. doi: 10.1056/NEJMoa2204619. Epub 2022 Jun 3. PMID: 35658005.
56. Kadivar A, Kamalidehghan B, Akbari Javar H, Karimi B, Sedghi R, Noordin MI. Antiproliferation effect of imatinib mesylate on MCF7, T-47D tumorigenic and MCF 10A nontumorigenic breast cell lines via PDGFR- β , PDGF-BB, c-Kit and SCF genes. *Drug Des Devel Ther.* 2017 Feb 21;11:469-481. doi: 10.2147/DDDT.S124102. PMID: 28260860; PMCID: PMC5327915.
57. Kalandidi A, Katsouyanni K, Voropoulou N, Bastas G, Saracci R, Trichopoulos D. Passive smoking and diet in the etiology of lung cancer among non-smokers. *Cancer Causes Control.* 1990 Jul;1(1):15-21. doi: 10.1007/BF00053179. PMID: 1966316.
58. Khan YS, Lynch DT. Histology, Lung. 2022 May 8. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan—. PMID: 30521210.

59. Kowalski S, Karska J, Łapińska Z, Hetnał B, Saczko J, Kulbacka J. An overview of programmed cell death: Apoptosis and pyroptosis-Mechanisms, differences, and significance in organism physiology and pathophysiology. *J Cell Biochem.* 2023 Jun 3. doi: 10.1002/jcb.30413. Epub ahead of print. PMID: 37269535.
60. Lakshmanan I, Ponnusamy MP, Macha MA, Haridas D, Majhi PD, Kaur S, Jain M, Batra SK, Ganti AK. Mucins in lung cancer: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications. *J Thorac Oncol.* 2015 Jan;10(1):19-27. doi: 10.1097/JTO.0000000000000404. PMID: 25319180.
61. Lamers-Kok N, Panella D, Georgoudaki AM, Liu H, Özkazanc D, Kučerová L, Duru AD, Spanholtz J, Raimo M. Natural killer cells in clinical development as non-engineered, engineered, and combination therapies. *J Hematol Oncol.* 2022 Nov 8;15(1):164. doi: 10.1186/s13045-022-01382-5. PMID: 36348457; PMCID: PMC9644572.
62. Lee A. Sotorasib: A Review in KRAS G12C Mutation-Positive Non-small Cell Lung Cancer. *Target Oncol.* 2022 Nov;17(6):727-733. doi: 10.1007/s11523-022-00922-w. Epub 2022 Oct 31. Erratum in: *Target Oncol.* 2022 Dec 2;: PMID: 36315377; PMCID: PMC9715446.
63. Lee L, Ito T, Jensen RT. Everolimus in the treatment of neuroendocrine tumors: efficacy, side-effects, resistance, and factors affecting its place in the treatment sequence. *Expert Opin Pharmacother.* 2018 Jun;19(8):909-928. doi: 10.1080/14656566.2018.1476492. Epub 2018 May 24. PMID: 29757017; PMCID: PMC6064188.
64. Leung ELH, Luo LX, Liu ZQ, Wong VKW, Lu LL, Xie Y, Zhang N, Qu YQ, Fan XX, Li Y, Huang M, Xiao DK, Huang J, Zhou YL, He JX, Ding J, Yao XJ, Ward DC, Liu L. Inhibition of KRAS-dependent lung cancer cell growth by deltarasin: blockage of autophagy increases its cytotoxicity. *Cell Death Dis.* 2018 Feb 13;9(2):216. doi: 10.1038/s41419-017-0065-9. PMID: 29440631; PMCID: PMC5833846.
65. Li D, Shi J, Liang D, Ren M, He Y. Lung cancer risk and exposure to air pollution: a multicenter North China case-control study involving 14604

- subjects. *BMC Pulm Med.* 2023 May 24;23(1):182. doi: 10.1186/s12890-023-02480-x. PMID: 37226220.
66. Li L, Liu S, Han D, Tang B, Ma J. Delivery and Biosafety of Oncolytic Virotherapy. *Front Oncol.* 2020 Apr 16;10:475. doi: 10.3389/fonc.2020.00475. PMID: 32373515; PMCID: PMC7176816.
67. Li S, Wang L, Wang Y, Zhang C, Hong Z, Han Z. The synthetic lethality of targeting cell cycle checkpoints and PARPs in cancer treatment. *J Hematol Oncol.* 2022 Oct 17;15(1):147. doi: 10.1186/s13045-022-01360-x. PMID: 36253861; PMCID: PMC9578258.
68. Li S, Wang L, Wang Y, Zhang C, Hong Z, Han Z. The synthetic lethality of targeting cell cycle checkpoints and PARPs in cancer treatment. *J Hematol Oncol.* 2022 Oct 17;15(1):147. doi: 10.1186/s13045-022-01360-x. PMID: 36253861; PMCID: PMC9578258.
69. Li X, Jiang Y, Meisenhelder J, Yang W, Hawke DH, Zheng Y, Xia Y, Aldape K, He J, Hunter T, Wang L, Lu Z. Mitochondria-Translocated PGK1 Functions as a Protein Kinase to Coordinate Glycolysis and the TCA Cycle in Tumorigenesis. *Mol Cell.* 2016 Mar 3;61(5):705-719. doi: 10.1016/j.molcel.2016.02.009. PMID: 26942675; PMCID: PMC4888784.
70. Liang C, Shi S, Qin Y, Meng Q, Hua J, Hu Q, Ji S, Zhang B, Xu J, Yu XJ. Localisation of PGK1 determines metabolic phenotype to balance metastasis and proliferation in patients with SMAD4-negative pancreatic cancer. *Gut.* 2020 May;69(5):888-900. doi: 10.1136/gutjnl-2018-317163. Epub 2019 Oct 14. Erratum in: *Gut.* 2022 Apr;71(4):e5. PMID: 31611300.
71. Liu C, Ye D, Yang H, Chen X, Su Z, Li X, Ding M, Liu Y. RAS-targeted cancer therapy: Advances in drugging specific mutations. *MedComm (2020).* 2023 May 27;4(3):e285. doi: 10.1002/mco2.285. PMID: 37250144; PMCID: PMC10225044.
72. Liu J, Fu M, Wang M, Wan D, Wei Y, Wei X. Cancer vaccines as promising immuno-therapeutics: platforms and current progress. *J Hematol Oncol.* 2022

Mar 18;15(1):28. doi: 10.1186/s13045-022-01247-x. PMID: 35303904; PMCID: PMC8931585.

73. Liu L, Zhu M, Meng Q, Wang Y, Zhao Y, Xie D, Zhang L, Zhao MH. Association between kidney function and the risk of cancer: Results from the China Health and Retirement longitudinal study (CHARLS). *J Cancer*. 2020 Sep 13;11(21):6429-6436. doi: 10.7150/jca.47175. PMID: 33033526; PMCID: PMC7532505.
74. Liu P, Zhao L, Pol J, Levesque S, Petrazzuolo A, Pfirschke C, Engblom C, Rickelt S, Yamazaki T, Iribarren K, Senovilla L, Bezu L, Vacchelli E, Sica V, Melis A, Martin T, Xia L, Yang H, Li Q, Chen J, Durand S, Aprahamian F, Lefevre D, Broutin S, Paci A, Bongers A, Minard-Colin V, Tartour E, Zitvogel L, Apetoh L, Ma Y, Pittet MJ, Kepp O, Kroemer G. Crizotinib-induced immunogenic cell death in non-small cell lung cancer. *Nat Commun*. 2019 Apr 2;10(1):1486. doi: 10.1038/s41467-019-09415-3. Erratum in: *Nat Commun*. 2019 Apr 17;10(1):1883. PMID: 30940805; PMCID: PMC6445096.
75. Llovet JM, Singal AG, Villanueva A, Finn RS, Kudo M, Galle PR, Ikeda M, Callies S, McGrath LM, Wang C, Abada P, Widau RC, Gonzalez-Gugel E, Zhu AX. Prognostic and Predictive Factors in Patients with Advanced HCC and Elevated Alpha-Fetoprotein Treated with Ramucirumab in Two Randomized Phase III Trials. *Clin Cancer Res*. 2022 Jun 1;28(11):2297-2305. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-21-4000. PMID: 35247922; PMCID: PMC9662930.
76. Mackenzie GG, Bartels LE, Xie G, Papayannis I, Alston N, Vrankova K, Ouyang N, Rigas B. A novel Ras inhibitor (MDC-1016) reduces human pancreatic tumor growth in mice. *Neoplasia*. 2013 Oct;15(10):1184-95. doi: 10.1593/neo.131368. PMID: 24204197; PMCID: PMC3819634.
77. Masri, M., McManus, M. & Mudad, R. Treatment of Advanced Non-Small Cell Lung Cancer in the Era of Targeted Therapy. *Curr Pulmonol Rep* 7, 79–91 (2018). <https://doi.org/10.1007/s13665-018-0204-5>

78. McCarthy MJ, Pagba CV, Prakash P, Naji AK, van der Hoeven D, Liang H, Gupta AK, Zhou Y, Cho KJ, Hancock JF, Gorfe AA. Discovery of High-Affinity Noncovalent Allosteric KRAS Inhibitors That Disrupt Effector Binding. *ACS Omega*. 2019 Feb 28;4(2):2921-2930. doi: 10.1021/acsomega.8b03308. Epub 2019 Feb 8. PMID: 30842983; PMCID: PMC6396121.
79. Moghadam AR, Patrad E, Tafhiri E, Peng W, Fangman B, Pluard TJ, Accurso A, Salacz M, Shah K, Ricke B, Bi D, Kimura K, Graves L, Najad MK, Dolatkhah R, Sanaat Z, Yazdi M, Tavakolinia N, Mazani M, Amani M, Ghavami S, Gartell R, Reilly C, Naima Z, Esfandyari T, Farassati F. Ral signaling pathway in health and cancer. *Cancer Med*. 2017 Dec;6(12):2998-3013. doi: 10.1002/cam4.1105. Epub 2017 Oct 18. PMID: 29047224; PMCID: PMC5727330.
80. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc*. 2008 May;83(5):584-94. doi: 10.4065/83.5.584. PMID: 18452692; PMCID: PMC2718421.
81. Montagne F, Guisier F, Venissac N, Baste JM. The Role of Surgery in Lung Cancer Treatment: Present Indications and Future Perspectives-State of the Art. *Cancers (Basel)*. 2021 Jul 23;13(15):3711. doi: 10.3390/cancers13153711. PMID: 34359612; PMCID: PMC8345199.
82. Muniyan S, Rachagani S, Parte S, Halder S, Seshacharyulu P, Kshirsagar P, Siddiqui JA, Vengoji R, Rauth S, Islam R, Mallya K, Datta K, Xi L, Das A, Teply BA, Kukreja RC, Batra SK. Sildenafil Potentiates the Therapeutic Efficacy of Docetaxel in Advanced Prostate Cancer by Stimulating NO-cGMP Signaling. *Clin Cancer Res*. 2020 Nov 1;26(21):5720-5734. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-1569. Epub 2020 Aug 26. PMID: 32847934; PMCID: PMC7642013.
83. Muratcioglu S, Jang H, Gursoy A, Keskin O, Nussinov R. PDE δ Binding to Ras Isoforms Provides a Route to Proper Membrane Localization. *J Phys Chem B*. 2017 Jun 22;121(24):5917-5927. doi: 10.1021/acs.jpccb.7b03035. Epub 2017 Jun 7. PMID: 28540724; PMCID: PMC7891760.

84. Nasri A, Foisset F, Ahmed E, Lahmar Z, Vachier I, Jorgensen C, Assou S, Bourdin A, De Vos J. Roles of Mesenchymal Cells in the Lung: From Lung Development to Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Cells*. 2021 Dec 9;10(12):3467. doi: 10.3390/cells10123467. PMID: 34943975; PMCID: PMC8700565.
85. Niu X, Shi Y, Li Q, Chen H, Fan X, Yu Y, Lv C, Lu J. Ginsenoside Rb₁ for overcoming cisplatin-insensitivity of A549/DDP cells *In vitro* and vivo through the dual-inhibition on two efflux pumps of ABCB1 and PTCH1. *Phytomedicine*. 2023 Jul;115:154776. doi: 10.1016/j.phymed.2023.154776. Epub 2023 Mar 18. PMID: 37087793.
86. Noguchi M, Furukawa KT, Morimoto M. Pulmonary neuroendocrine cells: physiology, tissue homeostasis and disease. *Dis Model Mech*. 2020 Dec 21;13(12):dmm046920. doi: 10.1242/dmm.046920. PMID: 33355253; PMCID: PMC7774893.
87. Nooreldeen R, Bach H. Current and Future Development in Lung Cancer Diagnosis. *Int J Mol Sci*. 2021 Aug 12;22(16):8661. doi: 10.3390/ijms22168661. PMID: 34445366; PMCID: PMC8395394.
88. Nuevo-Tapioles C, Philips MR. The role of KRAS splice variants in cancer biology. *Front Cell Dev Biol*. 2022 Nov 1;10:1033348. doi: 10.3389/fcell.2022.1033348. PMID: 36393833; PMCID: PMC9663995. 10.1038/s41392-023-01441-4. PMID: 37221195; PMCID: PMC10205766.
89. Nussinov R, Zhang M, Maloney R, Jang H. Ras isoform-specific expression, chromatin accessibility, and signaling. *Biophys Rev*. 2021 Jul 31;13(4):489-505. doi: 10.1007/s12551-021-00817-6. PMID: 34466166; PMCID: PMC8355297.
90. Organización estructural del sistema respiratorio. (2020/12/12). Enfermería.Top. <https://enfermeria.top/apuntes/fisiopatologia/sistema-respiratorio/organizacion-sistema-respiratorio/>.
91. Patcas A, Chis AF, Militaru CF, Bordea IR, Rajnoveanu R, Coza OF, Hanna R, Tiberiu T, Todea DA. An insight into lung cancer: a comprehensive review

- exploring ALK TKI and mechanisms of resistance. *Bosn J Basic Med Sci.* 2022 Feb 1;22(1):1-13. doi: 10.17305/bjbms.2021.5859. PMID: 34082691; PMCID: PMC8860314.
92. Peters S, Camidge DR, Shaw AT, Gadgeel S, Ahn JS, Kim DW, Ou SI, Pérol M, Dziadziuszko R, Rosell R, Zeaiter A, Mitry E, Golding S, Balas B, Noe J, Morcos PN, Mok T; ALEX Trial Investigators. Alectinib versus Crizotinib in Untreated ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2017 Aug 31;377(9):829-838. doi: 10.1056/NEJMoa1704795. Epub 2017 Jun 6. PMID: 28586279.
93. Pijuan J, Barceló C, Moreno DF, Maiques O, Sisó P, Marti RM, Macià A, Panosa A. *In vitro* Cell Migration, Invasion, and Adhesion Assays: From Cell Imaging to Data Analysis. *Front Cell Dev Biol.* 2019 Jun 14;7:107. doi: 10.3389/fcell.2019.00107. PMID: 31259172; PMCID: PMC6587234.
94. Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev.* 2007 Feb;33(1):9-23. doi: 10.1016/j.ctrv.2006.09.006. Epub 2006 Nov 3. PMID: 17084534; PMCID: PMC1855222.
95. Reck M, Remon J, Hellmann MD. First-Line Immunotherapy for Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 2022 Feb 20;40(6):586-597. doi: 10.1200/JCO.21.01497. Epub 2022 Jan 5. Erratum in: *J Clin Oncol.* 2022 Apr 10;40(11):1265. doi: 10.1200/JCO.22.00560. PMID: 34985920.
96. Rey-Reñones C, Baena-Díez JM, Aguilar-Palacio I, Miquel C, Grau M. Type 2 Diabetes Mellitus and Cancer: Epidemiology, Physiopathology and Prevention. *Biomedicines.* 2021 Oct 9;9(10):1429. doi: 10.3390/biomedicines9101429. PMID: 34680546; PMCID: PMC8533606.
97. Rezano A, Ridhayanti F, Rangkuti AR, Gunawan T, Winarno GNA, Wijaya I. Cytotoxicity of Simvastatin in Human Breast Cancer MCF-7 and MDA-MB-231 Cell Lines. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2021 Feb 1;22(S1):33-42. doi: 10.31557/APJCP.2021.22.S1.33. PMID: 33576210.

98. Roerink SF, Sasaki N, Lee-Six H, Young MD, Alexandrov LB, Behjati S, Mitchell TJ, Grossmann S, Lightfoot H, Egan DA, Pronk A, Smakman N, van Gorp J, Anderson E, Gamble SJ, Alder C, van de Wetering M, Campbell PJ, Stratton MR, Clevers H. Intra-tumour diversification in colorectal cancer at the single-cell level. *Nature*. 2018 Apr;556(7702):457-462. doi: 10.1038/s41586-018-0024-3. Epub 2018 Apr 11. PMID: 29643510.
99. Rossi A, Di Maio M. Platinum-based chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: optimal number of treatment cycles. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2016 Jun;16(6):653-60. doi: 10.1586/14737140.2016.1170596. Epub 2016 Apr 8. PMID: 27010977.
100. Salgia R, Pharaon R, Mambetsariev I, Nam A, Sattler M. The improbable targeted therapy: KRAS as an emerging target in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Cell Rep Med*. 2021 Jan 19;2(1):100186. doi: 10.1016/j.xcrm.2020.100186. PMID: 33521700; PMCID: PMC7817862. Scagliotti GV, Parikh P, von Pawel J, Biesma B, Vansteenkiste J, Manegold C, Serwatowski P, Gatzemeier U, Digumarti R, Zukin M, Lee JS, Mellemaard A, Park K, Patil S, Rolski J, Goksel T, de Marinis F, Simms L, Sugarman KP, Gandara D. Phase III Study Comparing Cisplatin Plus Gemcitabine With Cisplatin Plus Pemetrexed in Chemotherapy-Naive Patients With Advanced-Stage Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2023 May 10;41(14):2458-2466. doi: 10.1200/JCO.22.02544. PMID: 37146426.
101. Sangweni NF, Dlodla PV, Chellan N, Mabasa L, Sharma JR, Johnson R. The Implication of Low Dose Dimethyl Sulfoxide on Mitochondrial Function and Oxidative Damage in Cultured Cardiac and Cancer Cells. *Molecules*. 2021 Dec 1;26(23):7305. doi: 10.3390/molecules26237305. PMID: 34885888; PMCID: PMC8658933.
102. Sharma R. Mapping of global, regional and national incidence, mortality and mortality-to-incidence ratio of lung cancer in 2020 and 2050. *Int J Clin Oncol*. 2022 Apr;27(4):665-675. doi: 10.1007/s10147-021-02108-2. Epub 2022 Jan 12. PMID: 35020103; PMCID: PMC8753949.

103. Shen J, Wang Q, Mao Y, Gao W, Duan S. Targeting the p53 signaling pathway in cancers: Molecular mechanisms and clinical studies. *MedComm* (2020). 2023 May 28;4(3):e288. doi: 10.1002/mco2.288. PMID: 37256211; PMCID: PMC10225743.
104. Shetu SA, James N, Rivera G, Bandyopadhyay D. Molecular Research in Pancreatic Cancer: Small Molecule Inhibitors, Their Mechanistic Pathways and Beyond. *Curr Issues Mol Biol*. 2023 Feb 27;45(3):1914-1949. doi: 10.3390/cimb45030124. PMID: 36975494; PMCID: PMC10047141.
105. Simanshu DK, Nissley DV, McCormick F. RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. *Cell*. 2017 Jun 29;170(1):17-33. doi: 10.1016/j.cell.2017.06.009. PMID: 28666118; PMCID: PMC5555610.
106. Simanshu DK, Nissley DV, McCormick F. RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. *Cell*. 2017 Jun 29;170(1):17-33. doi: 10.1016/j.cell.2017.06.009. PMID: 28666118; PMCID: PMC5555610.
107. Sodani K, Patel A, Kathawala RJ, Chen ZS. Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance. *Chin J Cancer*. 2012 Feb;31(2):58-72. doi: 10.5732/cjc.011.10329. Epub 2011 Nov 18. PMID: 22098952; PMCID: PMC3777468.
108. Solomon BJ, Liu G, Felip E, Mok TSK, Soo RA, Mazieres J, Shaw AT, de Marinis F, Goto Y, Wu YL, Kim DW, Martini JF, Messina R, Paolini J, Polli A, Thomaidou D, Toffalorio F, Bauer TM. Lorlatinib Versus Crizotinib in Patients With Advanced *ALK*-Positive Non-Small Cell Lung Cancer: 5-Year Outcomes From the Phase III CROWN Study. *J Clin Oncol*. 2024 May 31;JCO2400581. doi: 10.1200/JCO.24.00581. Epub ahead of print. PMID: 38819031.
109. Spiro SG, Silvestri GA. One hundred years of lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Sep 1;172(5):523-9. doi: 10.1164/rccm.200504-531OE. Epub 2005 Jun 16. PMID: 15961694.
110. Sun X, Perl AK, Li R, Bell SM, Sajti E, Kalinichenko VV, Kalin TV, Misra RS, Deshmukh H, Clair G, Kyle J, Crotty Alexander LE, Masso-Silva JA, Kitzmiller JA, Wikenheiser-Brokamp KA, Deutsch G, Guo M, Du Y, Morley MP,

- Valdez MJ, Yu HV, Jin K, Bardes EE, Zepp JA, Neithamer T, Basil MC, Zacharias WJ, Verheyden J, Young R, Bandyopadhyay G, Lin S, Ansong C, Adkins J, Salomonis N, Aronow BJ, Xu Y, Pryhuber G, Whitsett J, Morrisey EE; NHLBI LungMAP Consortium. A census of the lung: CellCards from LungMAP. *Dev Cell*. 2022 Jan 10;57(1):112-145.e2. doi: 10.1016/j.devcel.2021.11.007. Epub 2021 Dec 21. PMID: 34936882; PMCID: PMC9202574.
111. Tanday S. Sunitinib benefits patients with small-cell lung cancer. *Lancet Oncol*. 2015 Apr;16(4):e164. doi: 10.1016/S1470-2045(15)70120-8. Epub 2015 Mar 20. PMID: 25800889.
112. Testa U, Castelli G, Pelosi E. Lung Cancers: Molecular Characterization, Clonal Heterogeneity and Evolution, and Cancer Stem Cells. *Cancers (Basel)*. 2018 Jul 27;10(8):248. doi: 10.3390/cancers10080248. PMID: 30060526; PMCID: PMC6116004.
113. Tezcanli Kaymaz B, Bozok Cetintas V, Eroglu Z, Kosova B. Suppression of STAT3 by chemically modified siRNAs increases the chemotherapeutic sensitivity of parental and cisplatin-resistant non-small cell lung cancer cells. *J BUON*. 2014 Jan-Mar;19(1):145-52. PMID: 24659656.
114. Thakur SK, Singh DP, Choudhary J. Lung cancer identification: a review on detection and classification. *Cancer Metastasis Rev*. 2020 Sep;39(3):989-998. doi: 10.1007/s10555-020-09901-x. PMID: 32519151.
115. Travis WD. Lung Cancer Pathology: Current Concepts. *Clin Chest Med*. 2020 Mar;41(1):67-85. doi: 10.1016/j.ccm.2019.11.001. Epub 2020 Jan 2. PMID: 32008630.
116. Vigil D, Cherfils J, Rossman KL, Der CJ. Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nat Rev Cancer*. 2010 Dec;10(12):842-57. doi: 10.1038/nrc2960. Epub 2010 Nov 24. PMID: 21102635; PMCID: PMC3124093.
117. Vogel R, Laschinski G, Spielman H, Ehrlich W, Drevenstedt B, Klosa J, Kröger H. In vitro studies on genotoxicity and cytotoxicity of the anticancer

- drugs cisplatin and cofplaton, a caffeine-8-ether plus cisplatinum compound. *Mutat Res.* 1991 Dec;264(4):225-30. doi: 10.1016/0165-7992(91)90083-g. PMID: 1723504.
118. von Karstedt S, Walczak H. An unexpected turn of fortune: targeting TRAIL-Rs in KRAS-driven cancer. *Cell Death Discov.* 2020 Mar 17;6:14. doi: 10.1038/s41420-020-0249-4. PMID: 32194994; PMCID: PMC7078304.
119. Wang C, Lu D, Cronin-Fenton D, Huang C, Liew Z, Wei D, Qin G, Yu Y, Li J. Cardiovascular disease and risk of lung cancer incidence and mortality: A nationwide matched cohort study. *Front Oncol.* 2022 Sep 5;12:950971. doi: 10.3389/fonc.2022.950971. PMID: 36147909; PMCID: PMC9486704.
120. Wang H, Liu Y, Wang Y, Xu T, Xia G, Huang X. Umbelliprenin induces autophagy and apoptosis while inhibits cancer cell stemness in pancreatic cancer cells. *Cancer Med.* 2023 Jul 6. doi: 10.1002/cam4.6170. Epub ahead of print. PMID: 37409635.
121. Wang L, Ge L, You S, Liu Y, Ren Y. Lobectomy versus segmentectomy in patients with stage T (> 2 cm and ≤ 3 cm) N0M0 non-small cell lung cancer: a propensity score matching study. *J Cardiothorac Surg.* 2022 May 11;17(1):110. doi: 10.1186/s13019-022-01867-x. PMID: 35545793; PMCID: PMC9092858.
122. Wei D, Wang L, Zuo X, Maitra A, Bresalier RS. A Small Molecule with Big Impact: MRTX1133 Targets the KRASG12D Mutation in Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res.* 2024 Feb 16;30(4):655-662. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-23-2098. PMID: 37831007; PMCID: PMC10922474.
123. West HJ, McClelland M, Cappuzzo F, Reck M, Mok TS, Jotte RM, Nishio M, Kim E, Morris S, Zou W, Shames D, Das Thakur M, Shankar G, Socinski MA. Clinical efficacy of atezolizumab plus bevacizumab and chemotherapy in *KRAS*-mutated non-small cell lung cancer with *STK11*, *KEAP1*, or *TP53* comutations: subgroup results from the phase III IMpower150 trial. *J Immunother Cancer.* 2022 Feb;10(2):e003027. doi: 10.1136/jitc-2021-003027. PMID: 35190375; PMCID: PMC8862451.

124. Yao JC, Fazio N, Singh S, Buzzoni R, Carnaghi C, Wolin E, Tomasek J, Raderer M, Lahner H, Voi M, Pacaud LB, Rouyrre N, Sachs C, Valle JW, Fave GD, Van Cutsem E, Tesselaar M, Shimada Y, Oh DY, Strosberg J, Kulke MH, Pavel ME; RAD001 in Advanced Neuroendocrine Tumours, Fourth Trial (RADIANT-4) Study Group. Everolimus for the treatment of advanced, non-functional neuroendocrine tumours of the lung or gastrointestinal tract (RADIANT-4): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet*. 2016 Mar 5;387(10022):968-977. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00817-X. Epub 2015 Dec 17. PMID: 26703889; PMCID: PMC6063317.
125. Yin G, Huang J, Petela J, Jiang H, Zhang Y, Gong S, Wu J, Liu B, Shi J, Gao Y. Targeting small GTPases: emerging grasps on previously untamable targets, pioneered by KRAS. *Signal Transduct Target Ther*. 2023 May 23;8(1):212. doi:
126. Yu J, Zhang Y, Leung LH, Liu L, Yang F, Yao X. Efficacy and safety of angiogenesis inhibitors in advanced gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Hematol Oncol*. 2016 Oct 18;9(1):111. doi: 10.1186/s13045-016-0340-8. PMID: 27756337; PMCID: PMC5070169.
127. Yu M, Qi B, Xiaoxiang W, Xu J, Liu X. Baicalein increases cisplatin sensitivity of A549 lung adenocarcinoma cells via PI3K/Akt/NF- κ B pathway. *Biomed Pharmacother*. 2017 Jun;90:677-685. doi: 10.1016/j.biopha.2017.04.001. Epub 2017 Apr 14. PMID: 28415048.
128. Zhao Y, Wang Z, Shi X, Liu T, Yu W, Ren X, Zhao H. Effect of Chemotherapeutics on *In vitro* Immune Checkpoint Expression in Non-Small Cell Lung Cancer. *Technol Cancer Res Treat*. 2023 Jan-Dec;22:15330338231202307. doi: 10.1177/15330338231202307. PMID: 37728201; PMCID: PMC10515539.
129. Zhong T, Zhang J, Liu X, Li H. TRIM17-mediated ubiquitination and degradation of RBM38 promotes cisplatin resistance in non-small cell lung cancer. *Cell Oncol (Dordr)*. 2023 May 23. doi: 10.1007/s13402-023-00825-6. Epub ahead of print. PMID: 37219768.

130. Zhou P, Zhang S, Wang M, Zhou J. The Induction Mechanism of Ferroptosis, Necroptosis, and Pyroptosis in Inflammatory Bowel Disease, Colorectal Cancer, and Intestinal Injury. *Biomolecules*. 2023 May 11;13(5):820. doi: 10.3390/biom13050820. PMID: 37238692; PMCID: PMC10216135.
131. Zhu Z, Ni J, Cai X, Su S, Zhuang H, Yang Z, Chen M, Ma S, Xie C, Xu Y, Li J, Ge H, Liu A, Zhao L, Rao C, Xie C, Bi N, Hui Z, Zhu G, Yuan Z, Wang J, Zhao L, Zhou W, Rim CH, Navarro-Martin A, Vanneste BGL, Ruyscher D, Choi JI, Jassem J, Chang JY, Kepka L, Käsmann L, Milano MT, Van Houtte P, Suwinski R, Traverso A, Doi H, Suh YG, Noël G, Tomita N, Kowalchuk RO, Sio TT, Li B, Lu B, Fu X. International consensus on radiotherapy in metastatic non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res*. 2022 Sep;11(9):1763-1795. doi: 10.21037/tlcr-22-644. PMID: 36248338; PMCID: PMC9554677.
132. Zoń A, Bednarek I. Cisplatin in Ovarian Cancer Treatment-Known Limitations in Therapy Force New Solutions. *Int J Mol Sci*. 2023 Apr 20;24(8):7585. doi: 10.3390/ijms24087585. PMID: 37108749; PMCID: PMC10146189.